

Aus dem Institut für Hygiene
der Bundesanstalt für Milchforschung in Kiel

(Leiter: Prof.Dr. A. Tolle)

Arbeit vorgelegt über das Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität München

(Lehrstuhl Prof.Dr. G. Terplan)

**TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN
ZUR BEEINFLUSSUNG DES MILCHSTATUS
NACH FASCIOLIZIDAPPLIKATION BEIM
LAKTIERENDEN RIND**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

MANFRED J. KAISER

aus Bekdorf/Holst.

München 1977

Aus dem Institut für Hygiene
der Bundesanstalt für MilCHForschung in Kiel

(Leiter: Prof.Dr. A. Tolle)

Arbeit vorgelegt über das Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität München

(Lehrstuhl Prof.Dr. G. Terplan)

**TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN
ZUR BEEINFLUSSUNG DES MILCHSTATUS
NACH FASCIOLIZIDAPPLIKATION BEIM
LAKTIERENDEN RIND**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

MANFRED J. KAISER

aus Bekdorf/Holst.

München 1977

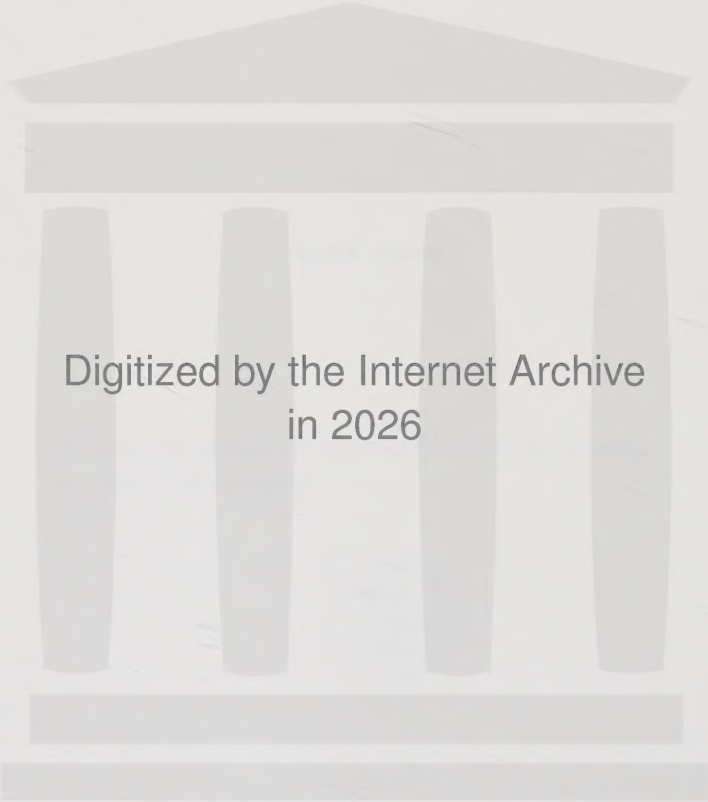
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München



Dekan:	Professor Dr. B. Vollmerhaus
Referent:	Professor Dr. G. Terplan
Korreferent:	Professor Dr. M. J. Forstner

Tag der Promotion: 29. Juli 1977

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

1. FINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG
2. SCHRIFTTUM
 - 2.1 Bedeutung der Fasciolose
 - 2.2 Biologie von *Fasciola hepatica* L.
 - 2.3 Einsatz von Fascioliziden beim Rind
 - 2.4 Chemische Struktur der eingesetzten Fasciolizide
 - 2.5 Fasciolizide als Rückstände in der Milch
 - 2.5.1 Bedeutung von Fasciolizidrückständen
 - 2.5.1.1 Lebensmittelhygienische Bedeutung
 - 2.5.1.2 Technologische Bedeutung
 - 2.5.2 Analytik
 - 2.5.3 Gesetzliche Regelungen
 - 2.5.3.1 Lebensmittelrecht
 - 2.5.3.2 Arzneimittelrecht
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN
 - 3.1 Material
 - 3.1.1 Versuchstierkollektiv
 - 3.1.2 Untersuchungssubstrate
 - 3.1.3 Probenahme
 - 3.2 Methodik
 - 3.2.1 Bestimmung des physiologisch-biochemischen Profils im Tagesgemelk
 - 3.2.1.1 Fettgehalt
 - 3.2.1.2 Anzahl somatischer Zellen
 - 3.2.1.3 pH-Wert
 - 3.2.1.4 Labgerinnungszeit
 - 3.2.1.5 Enzyme
 - 3.2.1.5.1 Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)
 - 3.2.1.5.2 Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)
 - 3.2.1.5.3 Alkalische Phosphatase (AP)

- 3.2.1.6 Laktose
- 3.2.1.7 Kationen
 - 3.2.1.7.1 Natrium (Na^+)
 - 3.2.1.7.2 Kalium (K^+)
 - 3.2.1.7.3 Magnesium (Mg^{++})
 - 3.2.1.7.4 Calcium (Ca^{++})
- 3.2.1.8 Anionen
 - 3.2.1.8.1 Chlorid (Cl^-)
 - 3.2.1.8.2 Phosphat (PO_4^{3-})
- 3.2.1.9 Metaboliten
 - 3.2.1.9.1 Pyruvat
 - 3.2.1.9.2 L(+)Lactat
 - 3.2.1.9.3 Freie Fettsäuren (FFA)
 - 3.2.1.9.4 Ammoniak (NH_3)
- 3.2.2 Prüfung der technologischen Wertigkeit der Milch
 - 3.2.2.1 pH-Wert
 - 3.2.2.2 Hemmstoffe
 - 3.2.2.2.1 Brillantschwarz-Reduktions-Test
 - 3.2.2.2.2 Joghurt-Test
 - 3.2.2.3 Gerinnungsfähigkeit (Thrombelastographie)
 - 3.2.2.4 Säuerungsverhalten
- 3.2.3 Analytik der Fasciolizidrückstände in der Milch
- 3.3 Ergebnisse
 - 3.3.1 Milchstatus vor und nach Bromphenophos-Applikation
 - 3.3.1.1 Physiologisch-biochemisches Profil
 - 3.3.1.2 Technologische Wertigkeit
 - 3.3.1.3 Rückstandsbildung
 - 3.3.2 Milchstatus vor und nach Niclofolan-Applikation (Therapeutische Dosis)
 - 3.3.2.1 Physiologisch-biochemisches Profil
 - 3.3.2.2 Technologische Wertigkeit
 - 3.3.2.3 Rückstandsbildung

- 3.3.3 Milchstatus vor und nach Niclofolan -Applikation
 (Erhöhte Dosis)
- 3.3.3.1 Physiologisch-biochemisches Profil
- 3.3.3.2 Technologische Wertigkeit
- 3.3.3.3 Rückstandsbildung
- 3.3.4 Milchstatus vor und nach Nitroxinil -Applikation
- 3.3.4.1 Physiologisch-biochemisches Profil
- 3.3.4.2 Technologische Wertigkeit
- 3.3.4.3 Rückstandsbildung
- 3.3.5 Milchstatus vor und nach Oxyclozanid -Applikation
- 3.3.5.1 Physiologisch-biochemisches Profil
- 3.3.5.2 Technologische Wertigkeit
- 3.3.5.3 Rückstandsbildung
- 4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE UND SCHLUSSFOLGERUNGEN
- 5. ZUSAMMENFASSUNG
- 6. LITERATURVERZEICHNIS

- 3.2.1.6 Laktose
- 3.2.1.7 Kationen
 - 3.2.1.7.1 Natrium (Na^+)
 - 3.2.1.7.2 Kalium (K^+)
 - 3.2.1.7.3 Magnesium (Mg^{++})
 - 3.2.1.7.4 Calcium (Ca^{++})
- 3.2.1.8 Anionen
 - 3.2.1.8.1 Chlorid (Cl^-)
 - 3.2.1.8.2 Phosphat (PO_4^{3-})
- 3.2.1.9 Metaboliten
 - 3.2.1.9.1 Pyruvat
 - 3.2.1.9.2 L(+)-Lactat
 - 3.2.1.9.3 Freie Fettsäuren (FFA)
 - 3.2.1.9.4 Ammoniak (NH_3)
- 3.2.2 Prüfung der technologischen Wertigkeit der Milch
 - 3.2.2.1 pH-Wert
 - 3.2.2.2 Hemmstoffe
 - 3.2.2.2.1 Brillantschwarz-Reduktions-Test
 - 3.2.2.2.2 Joghurt-Test
 - 3.2.2.3 Gerinnungsfähigkeit (Thrombelastographie)
 - 3.2.2.4 Säuerungsverhalten
- 3.2.3 Analytik der Fasciolizidrückstände in der Milch
- 3.3 Ergebnisse
 - 3.3.1 Milchstatus vor und nach Bromphenophos -Applikation
 - 3.3.1.1 Physiologisch-biochemisches Profil
 - 3.3.1.2 Technologische Wertigkeit
 - 3.3.1.3 Rückstandsbildung
 - 3.3.2 Milchstatus vor und nach Niclofolan -Applikation (Therapeutische Dosis)
 - 3.3.2.1 Physiologisch-biochemisches Profil
 - 3.3.2.2 Technologische Wertigkeit
 - 3.3.2.3 Rückstandsbildung

- 3.3.3 Milchstatus vor und nach Niclofolan -Applikation
 (Erhöhte Dosis)
- 3.3.3.1 Physiologisch-biochemisches Profil
- 3.3.3.2 Technologische Wertigkeit
- 3.3.3.3 Rückstandsbildung
- 3.3.4 Milchstatus vor und nach Nitroxinil -Applikation
- 3.3.4.1 Physiologisch-biochemisches Profil
- 3.3.4.2 Technologische Wertigkeit
- 3.3.4.3 Rückstandsbildung
- 3.3.5 Milchstatus vor und nach Oxyclozanid -Applikation
- 3.3.5.1 Physiologisch-biochemisches Profil
- 3.3.5.2 Technologische Wertigkeit
- 3.3.5.3 Rückstandsbildung
- 4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE UND SCHLUSSFOLGERUNGEN
- 5. ZUSAMMENFASSUNG
- 6. LITERATURVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die durch den großen Leberegel, *Fasciola hepatica* L., hervorgerufene Fasciolose oder Leberegelseuche gehört zu den bedeutsamsten Parasitosen des Rindes. Wirtschaftliche Einbußen entstehen überwiegend durch Konfiszierung ganz oder teilweise genußuntauglicher Lebern. Hinzu kommen erhebliche Schäden durch verminderte Gewichtszunahme vor allem jüngerer Tiere (Gesamtschäden siehe Kap. 2.1).

Maßnahmen zur Fasciolosebekämpfung liegen somit primär im unmittelbaren Interesse der Rinderhalter und der Fleischwirtschaft. Hierfür stehen langfristig nur weidehygienische Maßnahmen wie die Regulierung der Wasserhältnisse und insbesondere die Tränkwasserversorgung mit Grund- oder Leitungswasser im Vordergrund. Die Chemotherapie befallener Tiere mit Fascioliziden darf sich aus epidemiologischen Gründen nicht nur auf das Einzeltier beschränken, sondern muß zur Erfolgssicherung mindestens den gesamten Bestand, besser alle im Biotop des Parasiten exponierten Rinder und Schafe erfassen. Andererseits bringt der flächenhafte Einsatz von Fascioliziden, die in ihrer gebräuchlichen Formulierung seit nunmehr 20 Jahren zur Verfügung stehen, für die Milchwirtschaft und den Verbraucher Rückstandsprobleme mit sich:

Als pharmakologisch wirksame Substanz schädigen Fasciolizide nach der Applikation primär die Parasiten, können jedoch auch im Organismus des Säugers Wirkungen auslösen, die nicht zu den üblichen und situationsbedingten Lebensäußerungen gehören. Diese Chemotherapeutika werden letztlich über die Ausscheidungswege Urin und Faeces und bei laktierenden Kühen über die Milch als Originärschadstoff und/oder Metaboliten aus dem Organismus des Säugers eliminiert. Der Molkerei-Industrie können möglicherweise erhebliche Produktionsausfälle durch Störungen bei der Labkäseherstellung entstehen. Der Konsument ist durch die in der Milch nach einer Behandlung auftretenden Rückstände potentiell einem toxikologischen Risiko ausgesetzt. Zum Schutz des Verbrauchers ist der Rinderhalter durch Gesetz verpflichtet, die Milch behandelter Kühe fünf Tage lang nicht in den Verkehr zu bringen. Die hieraus entstehenden monetären Einbußen des Erzeugers lassen sich nach dem einfachen Zusammenhang: täglich abgelieferte Milchmenge $\times 5 \times 0,5$ [Milchpreis in DM] = Verlust abschätzen. Diese Summe kann zweimal im Jahr anfallen.

Da der Schutz des Verbrauchers absoluten Vorrang vor wirtschaftlichen Erwägungen hat, sollte jede flächenmäßig durchgeführte Behandlung mit Fascioliziden durch begleitende spezifische Rückstandskontrollen überwacht werden. Diese Untersuchungen müssen in entsprechend ausgerüsteten Zentral-Laboratorien durchgeführt werden.

Im internationalen Schrifttum liegen kaum Angaben darüber vor, ob und inwieweit sich das physiologisch-biochemische Profil von Milch behandelter Tiere nach der Anwendung von Fascioliziden in therapeutischer und erhöhter Dosis verändert und in welchem Umfang diese Veränderungen Rückschlüsse auf Störungen des tierischen Organismus und Aussagen hinsichtlich einer Beeinträchtigung der technologischen Wertigkeit der Milch zulassen.

Innerhalb der Arbeitsgruppe "Rückstandsforschung und Toxikologie" des Instituts für Hygiene der Bundesanstalt für Milchwissenschaft in Kiel wurde mir daher von Herrn Professor Dr. A. Tolle die Aufgabe gestellt,

1. mit Hilfe spezifischer, empfindlicher und leistungsfähiger Methoden die Wirkung einmaliger therapeutischer und erhöhter Dosen von Fascioliziden auf ausgewählte Parameter des physiologisch-biochemischen Profils der Milch zu messen,
2. die Einflüsse der Fasciolizid-Applikation (Art und Menge) auf die technologische Wertigkeit des Substrates unter vergleichbaren Bedingungen zu prüfen,
3. das Rückstandsverhalten von Fascioliziden zu bestimmen, und damit
4. das toxikologisch-hygienische Risiko für den Verbraucher abzuschätzen.

Darüber hinaus sollten die Untersuchungen auch dazu dienen, am Beispiel der Fasciolizide ein Modell zur Prüfung technologisch bedeutsamer Beeinflussungen des Milchstatus nach Arzneimittel-Applikation zu entwickeln. Der in dieser Arbeit verwendete Begriff "Milchstatus" umfaßt neben den Meßgrößen des physiologisch-biochemischen Profils der Milch zusätzlich die Rückstände der Fasciolizide.

2. SCHRIFTTUM

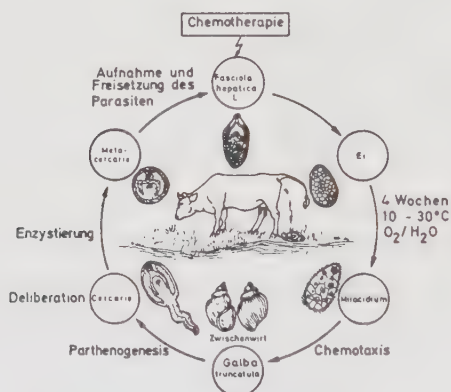
2.1 Bedeutung der Fasciolose

Die Fasciolose des Rindes ist weltweit verbreitet (14, 15, 16, 39, 42, 48, 63). Sie äußert sich hauptsächlich in einer chronischen Entzündung der Leber- und Gallengänge, die meist in eine Leberzirrhose übergeht. Damit verbunden sind Verdauungsstörungen, Abmagerung und allgemeine Leistungsminderung. Akute Entzündungen des Bauchfells und der Leber während der Wanderung des unreifen Parasiten nach Masseninvasion kommen beim großen Wiederkäuer kaum vor. Sie treten gehäuft beim Schaf, gelegentlich beim Jungrind auf und führen nicht selten zum Tode (47). Dabei schwankt die Häufigkeit des Nachweises dieser Invasionskrankheit in Gegenden ohne systematische Bekämpfung sowohl des Parasiten als auch des Zwischenwirtes zwischen 30% und etwa 80% der Rinderpopulation (63). Demgegenüber kann durch systematisch durchgeführte Bekämpfungsaktionen der Parasitenbefall nachhaltig auf weniger als 10% gesenkt werden (49). Dies gilt ohne gleichzeitige Melioration jedoch nur bei mindestens jährlicher Wiederholung der Bekämpfungsmaßnahmen (7). Günstig wirken sich außerdem anhaltend trockene Sommer aus, die den Entwicklungskreislauf des Parasiten auf natürliche Weise beeinträchtigen (41). Auf Grund der weiten Verbreitung und der hohen Befallsrate sind die durch den großen Leberegel verursachten monetären Schäden hoch: Vor Jahren wurden an Hand der Fleischbeschau-Statistik in der Bundesrepublik Deutschland jährliche Schäden um 300 Millionen DM ermittelt (46). In den Niederlanden beliefen sich die Verluste in der Region Friesland auf jährlich 150 Millionen DM (51). Diese Zahlenangaben beziehen sich nur auf direkte Einbußen durch Tod, Minderzunahme der Tiere und Konfiszierung der Lebern.

Zudem wird die Volkswirtschaft noch mit den Kosten belastet, die von öffentlicher Hand als Zuschuß zur Behandlung getragen werden. So wurden allein in Schleswig-Holstein im Jahre 1975 579.210 Tiere (davon ca. 12.000 Schafe) gegen Fasciolose behandelt, wobei DM 1.-- pro Tier als Zuschuß zu den Kosten des Medikamentes vom Land gezahlt wurde (37).

2.2 Biologie von *Fasciola hepatica* L. als Grundlage der Chemotherapie

Eine gezielte Chemotherapie setzt die Kenntnis des Kreislaufs und der Zeit der Entwicklung vom ausgeschiedenen Ei bis zum adulten Parasiten voraus (Einzelheiten siehe ROSENBERGER, 47). Der Entwicklungskreislauf des großen Leberegels wird in nachstehender Abbildung 1 schematisiert umrissen:



Entwicklungskreislauf von *Fasciola hepatica* L.

V176/692 La

Abbildung 1

Die Therapie soll nach der Aufstallung erfolgen. Hierdurch werden aber nicht diejenigen Egel erfasst, die noch im Lebergewebe auf der Wanderung sind. Diese müssen durch eine zweite Behandlung erfasst werden, deren Zeitpunkt sich aus folgenden Daten ergibt (5):

- | | |
|---------------------------------------|--------------|
| 1. Wanderungsdauer der jungen Larven: | 6 - 8 Wochen |
| 2. Ausbildung der Geschlechtsreife: | 3 - 4 Wochen |
| | <hr/> |
| | 9-12 Wochen |

Die zweite Behandlung sollte somit 9 - 12 Wochen nach der ersten erfolgen. Insgesamt braucht der Leberegel für seine Entwicklung vom ausgeschiedenen Ei bis zum adulten Parasiten mindestens ein halbes Jahr.

2.3 Einsatz von Fascioliziden beim Rind

Fasciolizide als Chemotherapeutika werden ein- oder zweimal jährlich in Bestandsbehandlungen eingesetzt (49). Bei starkem Befall ist eine Behandlung der Jungtiere im Oktober/November notwendig (6). Die gebräuchlichsten modernen Fasciolizide (1, 3, 9, 13, 18, 25, 42, 47, 65, 70), ihre Applikation, Dosierung und Wirksamkeit sind aus nachstehender Tabelle 1 ersichtlich:

FASCIOLIZIDE UND IHRE APPLIKATION, DOSIERUNG UND WIRKSAMKEIT BEIM RIND				
Merkmal Wirkstoff	Applikation	Dosierung mg/kg KG	Wirksamkeit	
			unreife Stadien	reife Stadien
Bromphenophos	oral	12	Gute Wirkung bei therapeutischer Dosis	85 - 100 %
Niclofolan	oral	3	Teilwirkung bei hohen Dosen	85 - 96,5%
Nitroxinil	subcutan	10	Gute Wirkung bei 1,3-facher Dosis	93 - 100 %
Oxyclozanid	oral	10	Mäßige Wirkung bei 4-facher Dosis	83 - 88,1%

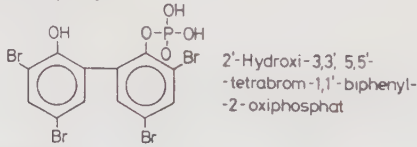
76/177 Lg

Tabelle 1

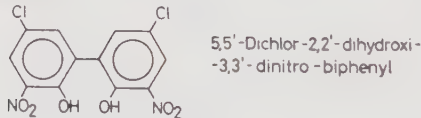
2.4 Chemische Struktur der untersuchten Fasciolizide

Die chemische Struktur der Wirkstoffe, die in den durchgeführten Versuchsserien an laktierenden Kühen eingesetzt wurden, geht aus Abbildung 2 hervor:

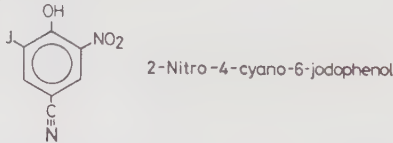
BROMPHENOPHOS



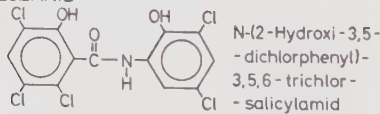
NICLOFOLAN



NITROXINIL



OXYCLOZANID



CHEMISCHE STRUKTUR

[16/193w]

Abbildung 2

Die diesen Wirkstoff enthaltenden Zubereitungen sind unter folgenden Handelsnamen erhältlich:

Bromphenophos:

Acedist

Niclofolan:

Bilevon

Nitroxinil:

Dovenix

Oxyclozanid:

Diplin



Die Wirkungsweise der Fasciolizide ist derzeit nur unvollständig geklärt. Zum Wirkstoff Niclofolan liegen Informationen zu seiner Wirkung auf den Parasiten vor. Danach greift diese Substanz deletär in den Energiehaushalt des Parasiten ein, indem die oxydative Phosphorylierung entkoppelt wird (3). Darüber hinaus zeigt dieser Wirkstoff beim Goldhamster teratogene Effekte, die sich in Skelettmißbildungen der Nachkommen äußern (29).

2.5 Fasciolizide als Rückstände in der Milch

Als schwache Säuren können die Wirkstoffe der Fasciolizide auf Grund ihrer chemischen Struktur und Dissoziationsfähigkeit in den Körperflüssigkeiten den Organismus des behandelten Tieres partiell über die Milchdrüse verlassen. Da die Blut-Milch-Schranke eine Membran darstellt, die durch Diffusion durchdrungen wird, kann der nicht-ionisierte Anteil der Wirkstoffe auf beiden Seiten der Membran gleich groß sein. Die Gesamt-Konzentration resultiert jedoch aus dem nicht-ionisierten und dem ionisierten Anteil. Der ionisierte Anteil der Substanz kann auf Grund der verschiedenen pH-Werte einen erheblichen Konzentrationsunterschied in der Milch und im Blut aufweisen. Damit ist auch die Gesamt-Konzentration ionisierter und nicht-ionisierter Anteile des Wirkstoffes verschieden.

Nach der Formel von HENDERSON-HASSELBALCH für schwache Säuren

$$\frac{\text{Konzentration}_{\text{Blut}}}{\text{Konzentration}_{\text{Milch}}} = \frac{1 + 10^{(\text{pH}_{\text{B}} - \text{pKa})}}{1 + 10^{(\text{pH}_{\text{M}} - \text{pKa})}}$$

ist die Konzentration eines Stoffes in Blut und Milch bei konstantem pH-Wert nur vom pKa-Wert der Substanz abhängig. Ferner folgt aus der Gleichung, daß die Konzentration schwacher Säuren in der Milch wegen des niedrigeren pH-Wertes gegenüber Blut geringer sein muß. Die pKa-Werte der vier Wirkstoffe konnten bisher nicht ermittelt werden (21).

2.5.1 Bedeutung von Fasciolizid-Rückständen

2.5.1.1 Lebensmittelhygienische Bedeutung

Wie von TOLLE u.a. (62) sowie HEESCHEN u.a. (23, 24) festgestellt wurde, treten Fasciolizide nach der Behandlung in der Milch als Rückstände in Konzentrationen bis zu 1 ppm auf. Die nachstehende Tabelle zeigt die "Peak-Konzentrationen" (24) und die nach Ablauf der gesetzlichen Fünf-Tage-Frist (§ 15 LMBG) noch vorliegenden Rückstände auf.

AUSSCHIEDUNG VON VIER FASCIOLIZIDEN MIT DER MILCH VON KÜHEN NACH APPLIKATION THERAPEUTISCHER DOSEN				
Wirkstoff Merkmal	Brom- phenophos	Niclofolan	Nitroxinil	Oxyclozanid
Peak-Konzentration (PK) ppm	1,5	0,06	1,46	0,13
t _{PK} h	24	48	12-36	48
K ₁₂₀ h	Ø 0,01	Ø 0,02	Ø 0,2	Ø 0,01

76/178 Lg

Tabelle 2

In Tabelle 2 bedeuten:

t_{PK} h = Zeit von der Applikation bis zum Auftreten der
"Peak-Konzentration" in der Milch

K₁₂₀ h = Konzentration des Wirkstoffes in der Milch
120 Stunden nach der Applikation

Wie zu ersehen, ist die maximale Ausscheidung (Peak-Konzentration) über die Milch 24 - 48 Stunden p.appl. zu erwarten.

Eine Modellbetrachtung ermöglicht die Abschätzung des toxikologischen Risikos für den Verbraucher durch in der Milch vorhandene Rückstände dieser pharmakologisch wirksamen Substanzen (24): In Langzeit-Tierversuchen ermittelten die Hersteller die für die jeweilige Versuchstierspecies gültige unwirksame Dosis (englisch: non effect level). Dieser Zahlenwert dividiert durch den Sicherheitsfaktor 100 ergibt

die für den Menschen anzuwendende "Duldbare Tägliche Aufnahmemenge" (DTA).

Die nachstehende Aufstellung (24) zeigt diese Grenzdosen (mg/kg Körpergewicht):

Bromphenophos	0,084
Niclofolan	0,0005
Nitroxinil	0,03
Oxyclozanid	0,05

Unter Berücksichtigung der vorstehenden DTA- und K_{120h} -Werte wird die Duldbare Tägliche Aufnahmemenge für die einzelnen Fasciolizide zu folgenden Prozentsätzen beim Verzehr von einem Liter (zur Zeit Pro-Kopf-Produktion in der BRD) kontaminierter Milch ausgeschöpft:

Bromphenophos	0,3 %
Niclofolan	37,04%
Nitroxinil	11,1 %
Oxyclozanid	0,63%

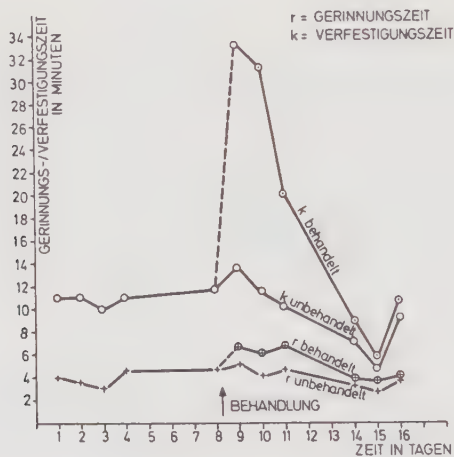
Die Modellbetrachtung wird dadurch jedoch erheblich eingeschränkt, daß die Rinderpopulation höchstens zweimal im Jahr mit Fascioliziden behandelt wird, der DTA jedoch lebenslange Exposition des Verbrauchers zu Grunde liegt.

2.5.1.2 Technologische Bedeutung

Die im Schrifttum publizierten Arbeiten zur Beeinflussung der technologischen Wertigkeit der Milch nach Bromphenophos-, Niclofolan-, Nitroxinil- und Oxyclozanid-Behandlung sind kaum vergleichbar, da der Beurteilung unterschiedliche Parameter zu Grunde liegen.

REUSS und HILLMANN (45) beschreiben die Auswirkungen der Behandlung mit Dovenix (Nitroxinil) auf pH-Wert, Fettgehalt, Labfähigkeit und Molkereitauglichkeit der Milch und kommen zu dem Ergebnis, daß diese Parameter nicht beeinflußt werden. Von HEISS (26) liegen Arbeiten zur Beeinflussung der Molkereitauglichkeit von Milch und der Milchleistung der Tiere nach einer Behandlung mit Diplin (Oxyclozanid) vor. Im einzelnen werden folgende Meßgrößen bewertet: Gäranlage, Säuerungsfähigkeit der Milch, Alkoholfestigkeit des Eiweißes, Säuregrad und pH-Wert der Milch, Labfähigkeit, Fettgehalt und Eiweißgehalt der Milch. Der Verfasser fand keine nachteilige Veränderung der Milch durch eine sachgerechte Diplin-Behandlung der Milchtiere.

Über die thrombelastographische Gerinnungsmessung fasciolizidhaltiger Milch liegen Angaben von KIND und HEESCHEN zu dem Wirkstoff Niclofolan vor (61). In Abbildung 4 sind diese Veränderungen dargestellt.

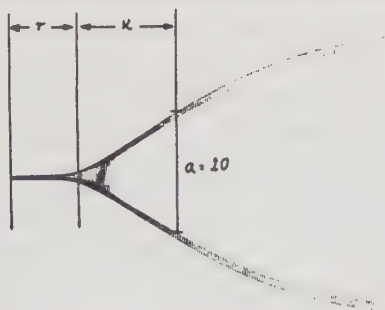


EINFLUSS EINER EINMALIGEN FASCIOLIZID-APPLIKATION IN VIER MILCHTIERHERDEN AUF DIE DURCHSCHNITTICHE ELASTOGRAPHISCHE GERINNUNGS-UND VERFESTIGUNGSZEIT DER SAMMELMILCHEN

[29/233 v.]

Abbildung 4

Die entsprechenden Thrombelastogramme der Abbildung 5 und 6 veranschaulichen die beträchtliche Verlängerung der Gerinnungs- und Verfestigungszeit der Herdensammelmilch nach der Behandlung der Tiere mit Niclofolan.



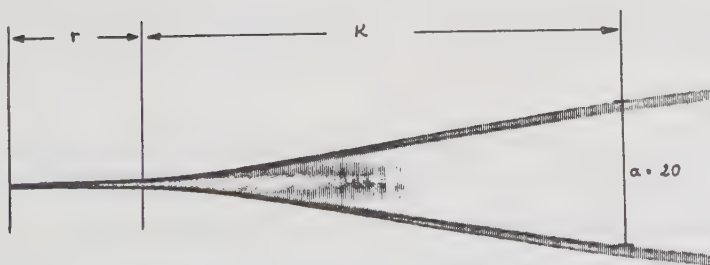
Thromb-Elastogramm einer Milchgallerte

r = Gerinnungszeit

k = Verfestigungszeit (k-Wert)

a = Amplitude von 20 mm

Abbildung 5



Thromb-Elastogramm einer Milchgallerte

r = Gerinnungszeit

k = Verfestigungszeit (k-Wert)

a = Amplitude von 20 mm

Abbildung 6

Für das Fasciolizid Acedist (Bromphenophos) werden von NEUMANN (40) nur geringe Erhöhungen des pH-Wertes und des Chloridgehaltes der Milch beschrieben.

2.5.2 Analytik

Als chemische Rückstände können Fasciolizide in der Milch mit verschiedenen chemisch-physikalischen Methoden quantifiziert und identifiziert werden.

Prinzipiell kommen hierfür die Gaschromatographie und Photometrie zur Anwendung. Die Fraktionierung der Milchprobe bis zu einem für die Endbestimmung ausreichend geeigneten, angereicherten Extrakt erfolgt in allen Fällen durch eine mehrfache Flüssig-Flüssig-Verteilung unter pH-Änderung in den einzelnen Schritten (24, 63).

Für den Nachweis der Wirkstoffe Niclofolan, Nitroxinil und Oxyclozanid wird Vollmilch in den ersten Analysengang eingebracht und nach Alkalisieren bzw. Ansäuern mit Chloroform oder einem anderen chlorierten Kohlenwasserstoff ausgeschüttelt. Während beim Nitroxinil hier bereits eine Abtrennung des Milchfettes in die Tetrachlorkohlenstoff-Phase erfolgt, wobei der Wirkstoff im alkalischen Medium verbleibt, werden Niclofolan und Oxyclozanid als Säurekomplex zusammen mit den Fettanteilen und Lipiden der Probe mit Chloroform extrahiert.

Zum Nachweis von Bromphenophos wird die Milch gefriergetrocknet, das Lyophilisat mehrfach mit n-Hexan entfettet und aus der rekonstituierten Magermilch der Rückstand anschließend mit Aceton/Chloroform extrahiert.

Im nächsten Schritt findet in allen Fällen eine pH-Umkehr statt, d. h., angesäuerte Trennsysteme werden alkalisiert und umgekehrt. Der sauer reagierende Wirkstoff (mit "intakten" Hydroxylgruppen) wird aus saurem Medium in ein polares organisches Lösungsmittel extrahiert, wobei er sich unter Salzbildung in alkalischen Lösungen (Natronlauge, Boratpuffer) löst. Diese Eigenschaft wird im Ablauf der Analyse zu einer möglichst wirksamen Abtrennung nicht-ampholytischer, in den einzelnen Schritten jedoch teilweise oder quantitativ mitextrahierbarer Begleitsubstanzen verwendet.

Vor der eigentlichen gaschromatographischen Endbestimmung muß der phenolische Rückstand dahingehend derivatisiert werden, daß die polaren Hydroxyl-Gruppen depolarisiert werden und das Molekül damit die Trennsäule niedriger bis mittlerer Polarität passieren kann. Bromphenophos wird in Acetonitril mit Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (BSA) silyliert. Dieses führt zu einem stabilen Austausch des Wasserstoffs an den phenolischen OH-Gruppen gegen Trimethylsilylreste. Besonders für Niclofolan, aber auch Nitroxinil und Oxyκλοzanid ist aus sterischen Gründen die Depolarisierung mit kleineren Resten an der betreffenden OH-Gruppe erforderlich. Als günstiges Verfahren hierzu hat sich die Methylierung mit Diazomethan in konzentrierter ätherischer Lösung erwiesen. Während Niclofolan und Nitroxinil innerhalb kürzester Zeit die relativ instabilen Ester bilden, benötigt Oxyκλοzanid eine Reaktionszeit unter Normalbedingungen von 12 - 18 Stunden.

Der gaschromatographische Nachweis erfolgt auf mittel- bis apolaren gepackten Trennsäulen normaler Dimensionierung mit Hilfe von Elektroneneinfangdetektoren. An die Empfindlichkeit des Systems werden ähnliche Ansprüche wie in der Analytik auf chlorierte Kohlenwasserstoffpestizide gestellt.

Der photometrische Nachweis ist in der Probenaufbereitung einfacher, der gaschromatographischen Endbestimmung aus Milch jedoch an Nachweisempfindlichkeit deutlich unterlegen (2, 5, 11, 52, 68).

2.5.3 Gesetzliche Regelungen

2.5.3.1 Lebensmittelrecht

Nach § 15 des "Gesetzes über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen (Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz)" vom 15. August 1974 ist es verboten, vom Tier gewonnene Lebensmittel gewerbsmäßig in den Verkehr zu bringen, wenn in oder auf ihnen Stoffe mit pharmakologischer Wirkung oder deren Umwandlungsprodukte vorhanden sind, die bestimmte Höchstmengen überschreiten.

Wenn Stoffe mit pharmakologischer Wirkung dem lebenden Tier zugeführt wurden, so dürfen die von dem Tier gewonnenen Lebensmittel gewerbsmäßig nur dann in den Verkehr gebracht werden, wenn die bei der Zulassung angegebenen Wartezeiten beachtet worden sind. Wurden Wartezeiten noch nicht eingeführt, so dürfen Lebensmittel, die früher als fünf Tage nach Zufuhr dieser Stoffe gewonnen worden

sind, gewerbsmäßig nicht in den Verkehr gebracht werden. Dies gilt nicht, soweit diese Stoffe oder ihre Umwandlungsprodukte in oder auf Lebensmitteln nicht vorhanden sind oder soweit Höchstmengen festgesetzt wurden bzw. andere Wartezeiten vorgeschrieben sind.

2.5.3.2 Arzneimittelrecht

Fasciolizide sind Arzneimittel im Sinne des § 1 (1) des Arzneimittelgesetzes vom 16. Mai 1961 in der Fassung vom 2. Juli 1975. Die zum Schutze des Verbrauchers vor gesundheitsgefährdenden Rückständen einzuhaltenden Wartezeiten nach Applikation an Tieren, die der Gewinnung von Lebensmitteln dienen, sind in § 10a (1) bis (4) genannt. Dabei ist entweder die Zeitdauer anzugeben, innerhalb derer bei bestimmungsgemäßer Anwendung mit Rückständen nach Art und Menge gesundheitlich nicht unbedenklicher Stoffe in den zu gewinnenden Lebensmitteln gerechnet werden muß, oder die Feststellung des Bundesgesundheitsamtes, daß die Einhaltung einer Wartezeit nicht erforderlich ist. Diese Angaben sind auf Behältnissen, äußeren Umhüllungen und Packungsbeilagen des Arzneimittels anzugeben.

In § 21 (Anmeldung der Arzneyspezialität) werden Untersuchungsergebnisse über den Verbleib der arzneilich wirksamen Bestandteile und der Umwandlungsprodukte im Tierkörper, insbesondere über den Weg und die Dauer der Ausscheidung gefordert, soweit diese für die Beurteilung von Wartezeiten erforderlich sind. Die Untersuchungsergebnisse müssen ferner erkennen lassen, daß die Wartezeiten Sicherheitsspannen enthalten.

Das "Gesetz zur Neuordnung des Arzneimittelrechts" vom 24. August 1976, das in seiner Gesamtheit am 1. Januar 1978 in Kraft tritt, regelt in Artikel 1 (Arzneimittelgesetz) in § 23 die "besonderen Unterlagen bei Arzneimitteln für Tiere". Die Angabe der Wartezeit in den Zulassungsunterlagen nach § 22 ist obligatorisch, sie ist zu begründen. Die entsprechenden Untersuchungsergebnisse werden mit dem Fachausdruck "Rückstandsprüfung" benannt (§ 24 (1) 4).

Die Anwendung bei Tieren, die der Gewinnung von Lebensmitteln dienen, ist im 9. Abschnitt : "Sondervorschriften für Arzneimittel, die zur Anwendung bei Tieren bestimmt sind" festgelegt. Nach § 58 dürfen diese Arzneimittel nur dann angewendet werden, wenn sie zugelassen sind (gemäß §§ 21 - 37).

Während das alte Gesetz hier von Anmeldung und Eintragung spricht, kennt die neue Fassung hierfür nur noch den Ausdruck "Zulassung".

Grundsätzlich ist demnach derzeit davon auszugehen, daß bis zur Festlegung spezifischer Wartezeiten gemäß § 23 des Gesetzes zur Neuordnung des Arzneimittelrechts eine Fünf-Tage-Frist einzuhalten ist, bevor die Milch Fasciolizid-behandelter Kühe in den Verkehr gebracht werden darf.

In wissenschaftlichen Diskussionen wird außerdem erörtert, ob nicht durch eine Staffelung der Behandlungen zu erreichen ist, daß in der den Molkereien angelieferten Milch möglicherweise vorhandene Fasciolizidrückstände unterhalb der "toxikologischen Irrelevanzgrenze" von 0,01 ppm liegen. Hierzu hat die Kommission zur Prüfung von Rückständen in Lebensmitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft in ihrer ersten Mitteilung 1975 eindeutig Stellung bezogen:

"Die Einstellung kontaminierter Milchen auf den Bereich einer toxikologischen Irrelevanz unterhalb einer Nachweisgrenze von 0,01 ppm/Milchbasis erscheint insofern bedenklich, als hiermit gegen das Prinzip verstoßen wird, den menschlichen Organismus nur mit der geringst möglichen Schadstoffmenge zu belasten. Trotz dieser Bedenken vermochte die Kommission kein anderes Verfahren vorzuschlagen, da über den Stoffwechsel, die Pharmakokinetik sowie die Wirkung der entstehenden Metaboliten zur Zeit nur sehr mangelhafte Kenntnisse vorliegen. Es ist jedoch anzustreben, daß großflächige Behandlungen gegen die Leberegelkrankheit des Rindes stets mit einer analytischen Kontrolle des Lebensmittels Milch einhergehen. Als Nachweisgrenze ist dabei ein Wert von 0,01 ppm anzusetzen. Die bestehenden gesetzlichen Regelungen des § 3 der 1. Ausführungsverordnung zum Milchgesetz sollten den individuellen Ausscheidungsverhältnissen der Fasciolizide angepaßt werden. Als Maß für die Dauer der Ausscheidung ist dabei derjenige Metabolit heranzuziehen, dessen Nachweis am längsten möglich ist" (12).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material

Für die Fort- bzw. Neuentwicklung geeigneter Verfahren zur Erfassung des physiologisch-biochemischen Profils der Milch, ihrer technologischen Verwertbarkeit und des Rückstandsstatus wurden sekretorisch und postsekretorisch mit den verschiedenen Wirkstoffen kontaminierte Proben verwendet. Die Messung der sekretorischen Rückstände und biochemischen Normalwerte erfolgte in der Milch behandelter und unbehandelter (Kontrollen) Versuchstiere. Allen durchgeführten Experimenten lagen im Regelfall die Anamnesewerte der Milch während der letzten drei bis fünf Tage vor der Behandlung zu Grunde.

3.1.1 Versuchstierkollektiv

Entsprechend der Fragestellung wurden in der Abteilung für Zoonosen- und Mastitis-Forschung des Instituts für Hygiene der Bundesanstalt für Milchforschung in Schaedtbek insgesamt 16 laktierende Kühe mit handelsüblichen Präparaten in therapeutischer Dosis behandelt. Aus der gleichen Herde und dem Versuchstierbestand der Abteilung für Tierernährung des Instituts für Milcherzeugung der Bundesanstalt für Milchforschung stammten je zwei Tiere für zwei weitere Versuche mit erhöhten Einzeldosen. Insgesamt erhielten somit 20 Einzeltiere Fasciolizide. Haltung und Fütterung der Tiere entsprachen der landwirtschaftlichen Praxis.

In zwei Feldversuchen zur Erfassung der Rückstandsmengen und potentiellen Substratveränderungen in der Herdensammelmilch wurden 45 bzw. 17 laktierende Kühe mit einem Präparat in therapeutischer Dosis behandelt. Im zweiten Versuch diente ein Bestand mit weiteren 17 Tieren als Kontrollgruppe.

3.1.2 Untersuchungssubstrate

Die institutseigene Versuchsstation lieferte für die umfangreichen Vorversuche zur Neu- bzw. Weiterentwicklung der verschiedenen unter 3.2 beschriebenen Methoden täglich frische, spezifisch-rückstandsfreie Milch. Diese Milch war in den Versuchsserien mit sekretorisch veränderter Milch zugleich Basissubstrat für die Quantifizierung der verschiedenen Meßgrößen nach der "standard-addition-method". Die Methode bietet den Vorteil, den Einfluß von Reagenzienleerwert und Rückgewinnungsrate auf das Ergebnis zu eliminieren, da in Standard und Probe stets die gleiche Matrix vorliegt. So sind sämtliche gemessenen Milchinhaltsstoffe und Rückstände innerhalb einer größeren Spanne um den Normalwert homogen mit Milch mischbar.

Zur Präparation gelangten insgesamt 200 Liter von dieser Milch neben rund 300 Litern sekretorisch kontaminierter Milch der behandelten Versuchstiere.

Aus dem Feldversuch (45 behandelte Tiere) wurden je 100 Liter Milch der Kontroll- und Versuchsphase in die Abteilung für Technologie des Instituts für Verfahrenstechnik der Bundesanstalt für Milchforschung geliefert, um den Einfluß der Kontamination auf die Herstellung von Hartkäse zu prüfen.

3.1.3 Probenahme

Die Probenahme erfolgte unmittelbar nach dem Melken aus dem individuellen Gesamtgemelk bzw. dem Sammeltank (Bestand) mit einer Edelstahlkelle in sterilisierte Baby-Flaschen aus Jenaer Glas. Nach einer Transportzeit von maximal 30 Minuten konnten die Proben im analytischen Labor weiter verarbeitet werden. Da nicht alle Parameter gleichzeitig gemessen werden konnten, ließen sich Probenteilmengen in PVC-Fläschchen abfüllen und bei -20°C bis zur Untersuchung lagern.

3.2 Methodik

3.2.1 Analyse des physiologisch-biochemischen Profils

Das normale bzw. pathologisch veränderte Profil ausgewählter Milchinhaltsstoffe der behandelten Tiere wurde auf der Basis der nachstehend aufgeführten Methoden für folgende Parameter erstellt:

- Fettgehalt
- Anzahl somatischer Zellen
- pH-Wert
- Labgerinnungszeit
- Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
- Glutamat-Pyruvat-Transaminase
- Alkalische Phosphatase
- Laktose
- Natrium-Ionen
- Kalium-Ionen
- Magnesium-Ionen

- Calcium-Ionen
- Chlor-Ionen
- Phosphat-Ionen
- Pyruvat
- L(+)-Laktat
- Freie Fettsäuren
- Ammoniak
- Brillantschwarz-Reduktions-Test
- Joghurt-Test
- Säuerung
- Rückstand

Durch die in dieser Arbeit bestimmten Parameter Labgerinnungszeit, pH-Wert und Calcium-Ionen-Konzentration ergibt sich eine indirekte Berücksichtigung des Milchproteins. Da für die Weiterverarbeitung des abgetrennten Milcheiweißes seine ungestörte Labgerinnungsfähigkeit bedeutender ist als seine absolute Menge, wurde auf eine direkte Bestimmung dieser Fraktion verzichtet.

Alle Methoden setzen eine vollständige Grundausrüstung des klinisch-chemischen Labors als Basis für höhere Spezialisierung voraus.

3.2.1.1 Fettgehalt

Prinzip der Methode:

Das Gerät arbeitet nach einer Colorimeter-Methode und besitzt ein selbst-reinigendes Meßsystem (22).

Geräte:

Bechergläser 150 ml
Wasserbad 40°C
Milkotester (Foss-Electric)

Chemikalien und Reagenzien:

Destilliertes Wasser
Versene-Lösung (45g Äthylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz + 9000 ml Aqua dest. pH 9,5 mit NaOH 4%ig). Auf 10 000 ml mit dest. Wasser auffüllen und Zugabe von 20 ml Tween 20. 24 Stunden auf Magnetrührer durchmischen, anschließend ist die Lösung gebrauchsfertig.

Vorbereitung der Proben:

Milchproben (50 ml) 20 Minuten bei 40°C im Wasserbad temperieren.

Durchführung der Messung:

- Milchprobe vom Gerät ansaugen lassen
- Mit Versene-Lösung in Meßküvette spülen
- Ergebnis ablesen und protokollieren
- Gerät mit dest. Wasser spülen

Sicherheit der Methode:

Im Bereich von 0% - 6% Fett: 0,15%.

3.2.1.2 Anzahl somatischer Zellen

Prinzip der Methode:

Die Vorbehandlung mit einem Emulgator-Elektrolyten zerstört die Fettkügelchen, die im Größenbereich der somatischen Zellen liegen. Somatische Zellen werden anschließend als einzige Partikel ihres Größenbereichs mit Hilfe elektronischer Teilchenzähler selektiv ausgezählt.

Geräte:

Reagenzgläser, 10 ml
Reagenzglasgestell
Pipetten, 1 und 5 ml
Glasfläschchen mit Schnappdeckel, 30 ml
Coulter Counter mit Kapillare (Durchmesser 100 μ)

Chemikalien und Reagenzien:

Formalin-Lösung 3,5%ig mit 0,28%o Eosin
Elektrolyt-Lösung: 76,1 g NaCl
 100,0 ml Formalin, 35%
 200,0 ml Triton X-100
 1250,0 ml Alkohol
 100,0 ml Tris-Puffer 6%
 ad 10000,0 ml mit Aqua dest. auffüllen

Die Elektrolyt-Lösung steril filtrieren und anschließend verwenden.

Vorbereitung der Proben:

- 5 ml Milch mit 0,1 ml Formalin-Eosin-Lösung gründlich vermischen
- staubdicht abgedeckt 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen lassen
- 0,1 ml der fixierten Probe mit 9,9 ml Elektrolyt-Lösung verdünnen und 12 Minuten auf 80°C erhitzen
- Probe abkühlen lassen

Durchführung der Messung:

- Gerät eichen
- Probe messen
- Ergebnis in 1000/ml angeben

Sicherheit der Methode:

Die Standard-Abweichung von Mehrfachansätzen beträgt $\leq 5\%$ vom Mittelwert.

3.2.1.3 pH-Wert

Geräte:

Bechergläser 100 ml
Magnetstab 30 ml
Magnetrührer
pH-Meter mit Einstabmeßkette und Stativ
(erforderliche Skalenspreizung pH 6,5 - 10,5)
Spritzflasche
Thermometer
Automatikbürette

Chemikalien und Reagenzien:

Doppelt destilliertes Wasser
Kaliumchlorid-Lösung 17,4%ig
Eichlösungen (pH 7, pH 4)
NaOH 4%ig

Vorbereitung der Proben:

Keine Probenvorbereitung.

Durchführung der Messung:

- 50 ml Milch in ein Becherglas geben
- Temperatur der Probe mit der am Gerät einzustellenden Größe abgleichen
- Magnetstäbchen (teflonisiert) zugeben und Probe leicht rühren
- Elektrode des Zwei-Punkt-geeichten pH-Meters am Stativ in die Probe senken
- pH-Wert ablesen und protokollieren

3.2.1.4 Labgerinnungszeit

Prinzip der Methode:

Der Thrombelastograph bestimmt kontinuierlich die Elastizität der eingelabten Milchgallerte und zeichnet das Ergebnis als Hüllkurve photographisch auf (59).

Geräte:

Glasfläschchen mit Schnappdeckel (PVC), 30 ml
Pipetten, 1 - 10 ml
Wasserbad 36,5°C
Stoppuhr
Gestell für Glasfläschchen
Thrombelastograph nach HARTERT zur Milchuntersuchung
Ultraschallbad

Chemikalien und Reagenzien:

Doppelt destilliertes Wasser
Labextrakt aus Kälbermagen (Käsereiqualität)
Paraffinöl
Reinigungsmittel
Dunkelkammerchemikalien

Vorbereitung der Proben:

- Thrombelastograph 30 Minuten vor Beginn der Messung anstellen
- Konzentrierte Lablösung mit kaltem destilliertem Wasser 1 : 100 verdünnen
- Milchproben 20 Minuten bei 36,5°C vorwärmen

Durchführung der Messung:

- Vorgewärmte Milch mit Lablösung versetzen (3%)
- Stoppuhr starten und Probe gründlich schütteln
- 0,3 ml Probe in Küvetten eingeben
- Torsionsstifte absenken
- exakt 3 Minuten nach Labzugabe Lichtweg öffnen
- automatische Registrierung des Meßvorganges auf Bromsilberpapier; Kontrolle der Lichtzeigerbewegung auf Mattscheibe.
- Beendigung der Messung nach Erreichen einer Amplitude von ~ 12 mm
- Registrierpapier bei Rotlicht entwickeln und fixieren
- Gerinnungszeit (r) durch Vermessen der Kurve ermitteln und protokollieren

Sicherheit der Methode:

Relativer Fehler: ca. 3%.

3.2.1.5 Enzyme

Aus dem breiten Enzymspektrum der Milch wurden die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und die Alkalische Phosphatase (AP) in der kontinuierlichen Durchflußanalyse des Auto-Analyzer-Systems bestimmt.

3.2.1.5.1 Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

Prinzip der Methode:

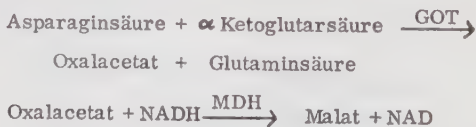


Abbildung 7

Die Messung beruht auf der Abnahme von NADH (57).

Geräte:

Erlenmeyer-Kolben 500 und 1000 ml
Pipetten 1 - 100 ml
Mikroliter-Spritzen oder -Pipetten
Heizbad
Magnetrührer mit Magnetstäbchen
AA-II-System mit Analyseneinheit für GOT

Chemikalien und Reagenzien:

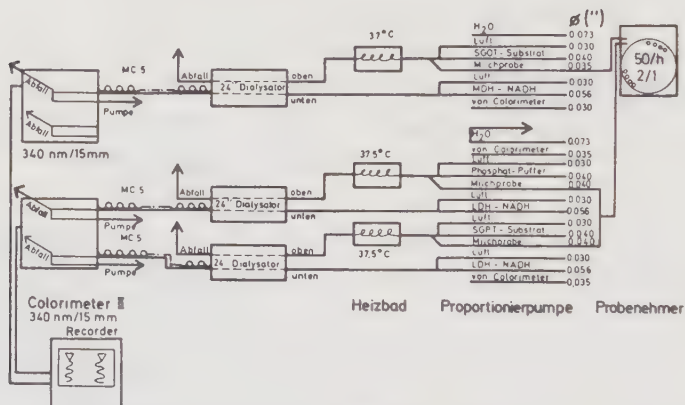
Substrat-Lösung:	74, 0 g L-Asparaginsäure 10, 6 g α -Ketoglutarsäure 27, 5 g Natronlauge 13, 6 g Kaliumdihydrogenphosphat werden in 500 ml dest. Wasser vorgelöst, pH-Einstellung auf 7, 4 und auf 1000 ml auffüllen
Phosphat-Puffer:	In 800 ml dest. Wasser 13, 6 g Kalium- dihydrogenphosphat lösen. Nach Auflösen Zugabe von 3, 3g Natronlauge. Anschließend pH auf 7, 4 einstellen und auf 1000 ml mit dest. Wasser auffüllen.
Enzym-Coenzym- Lösung:	Im 100-ml-Meßkolben 80 ml einer 0, 15%igen Albuminlösung im Phosphat- puffer mit 300 U MDH und 25 mg NADH_2 versetzen. Nach gründlicher Vermischung mit Albumin-Phosphat-Puffer-Lösung auf 100 ml auffüllen und die fertige Lösung zu je 25 ml einfrieren. Zur Verwendung 25 ml auftauen und mit 50 ml Phosphat-Puffer verdünnen.
Enzym:	GOT aus Schweineherz (2 mg/ml). Während der Analyse müssen alle Lösungen in einem Eisbad stehen.

Vorbereitung der Proben:

Keine Probenvorbereitung.

Durchführung der Messung:

Im oberen Teil der Abbildung 8 ist das Flußdiagramm für die GOT-Bestimmung wiedergegeben.



**GOT/GPT-Bestimmung in Milch und Serum
im Autoanalyzer-II-System (Simultane Anzeige auf-2 Kanal-Schreiber)**
25/770 CA

Abbildung 8

Gegenüber der für das klinische Labor ausgearbeiteten automatisierten Methode enthält die GOT-Bestimmung in Milch folgende Modifikationen:

- Vergrößerung der in das System eingehenden Probemenge, um eine sichere Anzeige der im Normalfall niedrigen, physiologischen Gehalte an GOT in der Milch zu erhalten.
- Verringerung der Probenfrequenz auf 50/h
- Stärkere Probensegmentierung
- Verminderte Verdünnung der Probe mit Puffer
- Quantifizierung der GOT-Gehalte mit Eichkurve
- Standardverdünnungsreihe in Milch von 1,6 - 100 mU/ml
- Standardlösung kann bedenkenlos wiederholt eingefroren und aufgetaut werden.

Sicherheit der Methode:

Standardabweichung: 0,89% vom Mittelwert der Proben.

3.2.1.5.2 Glutamat-Pyruvat-Transaminase

Prinzip der Methode:

Der Ablauf der GPT-Bestimmung in der kontinuierlichen Durchflußanalyse unterliegt folgendem Reaktionsschema

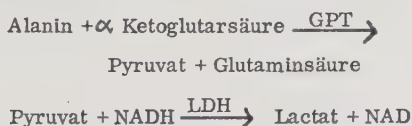


Abbildung 9

Die Abnahme von NADH wird bei 340 nm gemessen (58).

Geräte:

- Wie bei GOT
und AA-II-System mit Analyseneinheit für GPT
und Zwei-Kanal-Colorimeter (Blank-System)

Chemikalien und Reagenzien:

- | | |
|-----------------------|---|
| Substratlösung: | Im 1000 ml Meßkolben 500 ml Phosphat-puffer, 55,4 g L-Alanin und 3,46 g α -Ketoglutar säure lösen, pH-auf 7,4 einstellen und mit Phosphat-Puffer auf 1000 ml auffüllen. |
| Phosphat-Puffer: | Wie bei GOT |
| Enzym-Coenzym-Lösung: | Im 1000 ml Meßkolben 80 ml einer 0,15%igen Albuminlösung in Phosphat-Puffer mit 4000 U LDH und 25 mg NADH ₂ versetzen. Nach gründlicher Vermischung Albumin-Phosphat-Puffer-Lösung auf 100 ml auffüllen und die fertige Lösung mit 200 ml Phosphat-Puffer verdünnen. |
| Enzym: | GPT aus Schweineherz (2 mg/ml)
Während der Analyse müssen alle Lösungen im Eisbad stehen. |

Vorbereitung der Proben:

Keine Probenvorbereitung

Durchführung der Messung:

Das Flußdiagramm für die GPT-Bestimmung der Milch ist im unteren Teil der Abbildung 8 dargestellt. Zur Messung beide Kanäle der Analysen- und Detektionseinheit phasengleich abstimmen. Gehalte an GPT mit Hilfe einer Verdünnungsreihe (0,6 - 40 mU/ml) in Milch bestimmen.

Beide Enzyme, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und Glutamat-Pyruvat-Transaminase werden, wie dargestellt, unter Verwendung eines Zwei-Kanal-Schreibers, einer Pumpe und eines Probenehmers, jedoch mit zwei getrennten Analyseneinheiten und Colorimetern gemessen.

Die Auswertung der Analoganzeigen erfolgt wie bei GOT.

Änderungen für das Substrat Milch gegenüber der Originalmethode für das Auto-Analyzer-II-System:

- Vergrößerung der Probemenge
- Reduzieren der Phosphat-Puffer-Menge
- Stärkere Probensegmentierung durch Vergrößern der Luftschläuche
- Kleinerer Absaugschlauch der Küvette, um das Einsaugen von Segmentierbläschen in die Küvette zu vermeiden.

Zur Überprüfung von Reproduzierbarkeit und Variation der Analoganzeige für GOT und GPT wurden Standards in Milch als Proben zufällig zwischen die zu untersuchenden Milchproben auf den Probenteller gesetzt und mit Hilfe der üblichen, vorgeschalteten Standardserie quantifiziert. Dies erfolgte mehrmals während eines Arbeitstages im Abstand von jeweils rund 2 Stunden.

Sicherheit der Methode:

Reproduzierbarkeit: Abweichung von 3,64% vom Mittelwert.

Substrate und Verdünnungslösungen (Puffer) für die Methoden sind bei Kühlschranktemperatur mehrere Wochen haltbar. Mit standardisiertem GOT- bzw. GPT-Gehalt additiv versetzte Milch kann bedenkenlos wiederholt eingefroren und aufgetaut werden.

3.2.1.5.3 Alkalische Phosphatase

Prinzip der Methode:

Die Bestimmung der alkalischen Phosphatase beruht auf der enzymatischen Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat während der Inkubation bei 37,5°C. p-Nitrophenylphosphat dialysiert im AMP-Puffer. Das freie Paranitrophenol besitzt im alkalischen Milieu (pH-Wert des AMP-Puffers 10,25 pH) hohe Farbintensität. Die Absorption des Analysenstroms wird bei 410 nm gemessen (4,56).

Geräte: Wie bei GOT
 und AA-II-System mit Analyseneinheit für AP

Chemikalien und Reagenzien:

AMP-Puffer (5,57%, pH 10,25), fertige Lösung.

AP-Substrat: Im 1000 ml-Meßkolben unter Rühren 2 g para-Nitrophenylphosphat und 2 ml 1 M $MgCl_2$ -Lösung in 800 ml 4°C kaltem AMP-Puffer lösen. Nach Auflösen mit AMP-Puffer auf 1000 ml auffüllen. Der pH-Wert soll zwischen 6,2 und 6,4 liegen.

Enzym: AP aus Kälberdarm (5 mg/ml)

Vorbereitung der Proben:

Keine Probenvorbereitung.

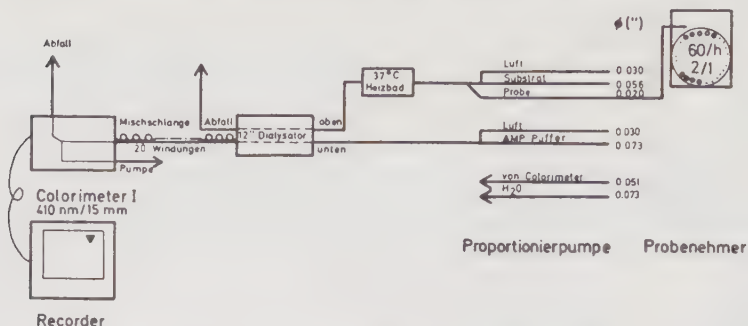
Durchführung der Messung:

Die automatisierte, enzymatische Bestimmung der alkalischen Phosphatase in Milch im Auto-Analyzer-II-System enthält folgende Modifikationen gegenüber der für Blutserum ausgearbeiteten Originalmethode:

- Verkleinerung des Probenahmeschlauchs
- Erhöhung der Pufferverdünnung im Rezeptorstrom durch stärkeren Schlauch
- Tausch von Colorimeter II aus apparatetechnischen Gründen gegen Colorimeter I
- Änderung von Probenahme- und Zwischenwaschraten von 60-9/1 auf 60-2/1.

Durch die oben aufgeführten Veränderungen konnte eine Verbesserung der linearen Anzeige zwischen 37,5 - 600 mU/ml erreicht werden.

Das für die Milchuntersuchung erstellte Flußdiagramm zeigt Abbildung 10:



Bestimmung der alkalischen Phosphatase in Milch und Serum im Autoanalyzer-II-System

VX/ST/Lo

Abbildung 10

Sicherheit der Methode:

Die Sicherheit der Methode läßt sich dadurch charakterisieren, daß die wiederholte Messung von zwei Standards (alkalische Phosphatase in Wasser) als Proben mit Hilfe der Tagesstandardserie eine mittlere Abweichung vom Sollwert zwischen 0% und 1, 04% ergab. Die Reproduzierbarkeit der Anzeige hängt sehr von der Temperatur der zugegebenen Reagenzien ab. Substrat- und Pufferlösungen, die bei Kühlschranktemperaturen gelagert werden, müssen vor Beginn der Messungen unbedingt auf Zimmertemperatur erwärmt werden. Dies gilt insbesondere für den AMP-Puffer, der unter Umgehung des Heizbades in den Dialysator fließt und das p-Nitrophenol aufnimmt.

3.2.1.6 Laktose

Prinzip der Methode:

Nachweis durch Reduktion von Kaliumferricyanid zu Kaliumferrocyanid in der kontinuierlichen Durchflußanalyse des Auto-Analyzer-II-Systems (10, 22, 27, 38).

Geräte:

Auto-Analyzer-II-System mit Analyseneinheit für
Laktose (Heizbad 95°C)

Chemikalien und Reagenzien:

Kochsalz-Lösung 0,9%

Laktose-Farbreagenz: In 800 ml dest. Wasser 9 g NaCl,
0,25 g Kaliumferricyanid, 20g
 Na_2CO_3 und 0,5 ml Levor IV lösen
und auf 1000 ml mit dest. Wasser auf-
füllen.

Vorrats-Laktose-Lösung: 100 g D(+)Laktose mit dest. Wasser auf
1000 ml auffüllen

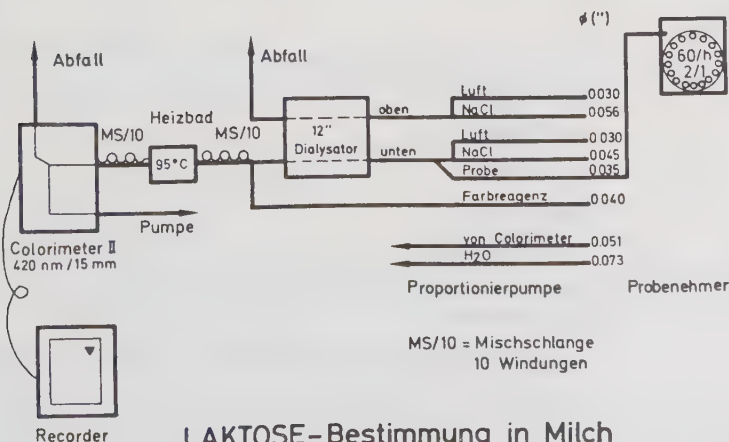
Arbeitsstandards Laktose: 3%, 4% und 5% in Wasser

Vorbereitung der Proben:

Keine Probenvorbereitung.

Durchführung der Messung:

- 2,5 ml Milch in die Probengefäße geben
- Das Flußdiagramm zur Laktose-Bestimmung ist aus Abbildung 11
zu ersehen.



**LAKTOSE-Bestimmung in Milch
im Autoanalyzer-II -System**

75/77 LG

Die Auswertung der Analogsignale erfolgt mit der aus den Standardhöhen konstruierten Eichkurve.

Sicherheit der Methode:

- Standardabweichung: maximal 8%
- Rückgewinnungsrate quantitativ (100, 11%).

3.2.1.7 Kationen

Die in der Milch vorkommenden Kationen Na^+ , K^+ und Mg^{++} wurden mit Hilfe der Atomabsorptionsspektralphotometrie bestimmt (35, 66). Wegen der schwierigen Ca-Bestimmung bei diesem Analysenverfahren erfolgte mit Beginn der Untersuchungen die Adaptation einer colorimetrischen Calciumbestimmung in Milch auf das Auto-Analyzer-II-System (38).

3.2.1.7.1 Natrium

Prinzip der Methode:

Nach dem Gesetz von LAMBERT-BEER absorbieren aus ihrem Molekülverband gelöste freie Atome Licht einer spezifischen Wellenlänge in Abhängigkeit ihrer Konzentration. Die Eigenschaft kommt im Atomabsorptionsspektralphotometer zur Verwendung.

Geräte:

Zu der Grundausstattung eines klinisch-chemischen Labors werden benötigt:

Glühtiegel 50 ml

Petrischale

Sandbäder

Gefrier Trocknung

Muffelofen mit langer Aufheizzeit und isothermer Nachheizphase

Atomabsorptionsspektralphotometer mit Luft-Azetylen-Brenner
Druckgase

Chemikalien und Reagenzien:

HNO_3 65%ig, suprapur

Doppelt destilliertes Wasser

NaCl p. A.

KCl p. A.

Eine Vorratslösung zum Ansatz der Arbeitsstandards soll 1 mg Na/ml enthalten und in einer Kautexflasche aufbewahrt werden. Zusatz von Kaliumchlorid-Lösung (2 mg K/ml) zur Ionisationsunterdrückung in der Luft-Azetylen-Flamme.

Natrium-Standards:

300, 400, 500, 600, 700, 800 mg Natrium / 1000 ml Wasser.

Vorbereitung der Proben:

- 30 ml Milch in Petrischale gefriertrocknen
- Trockenmasse in Glühtiegel überführen
- 6 Stunden veraschen bei 480°C , Aufheizzeit 4 Stunden.
- Asche mit 1, 5 ml HNO_3 anfeuchten.
- Im Sandbad bei 140°C trocknen
- 4 Stunden veraschen bei 480°C , Aufheizzeit 1 Stunde
- Asche mit 3 Tropfen HNO_3 und 30 ml doppelt destilliertem Wasser aufnehmen.

Durchführung der Messung:

- Justieren des Atomabsorptions-Gerätes auf die Absorptionswellenlänge von 330, 2 nm.
- Probe aus dem Tiegel in die Flamme aspirieren
- Auswertung mittels Eichkurve

Sicherheit der Methode:

- Abweichung bei Mehrfachbestimmung: maximal 2% vom Mittelwert.
- Rückgewinnungsrate: 83%.

3.2.1.7.2 Kalium

Bestimmung analog zu Natrium mit Hilfe der AAS. Abänderungen der oben beschriebenen Methode beziehen sich nur auf die verwendete Wellenlänge (766, 5 nm), die Konzentration der Standard-Lösungen (1000 - 2000 mg K/ 1000 ml) und die Stabilisierung der Standards mit Cäsiumchlorid (2 mg/ml). Die Rückgewinnungsrate beträgt 89, 3%.

3.2.1.7.3 Magnesium

Wegen der extrem hohen Nachweisempfindlichkeit ist die Magnesiumbestimmung mit Hilfe der Atomabsorptionsspektralphotometrie als die Methode der Wahl anzusehen. Sie erlaubt deshalb eine gute Differenzierung unterschiedlicher Werte.

Folgende Änderungen gegenüber der oben beschriebenen Methode für Natrium müssen berücksichtigt werden:

Wellenlänge (285, 2 nm)

Die Konzentration der Arbeitsstandards (50 - 200 mg Mg/
1000 ml)

Es ist kein Ionisationsdepressor nötig.

Die Rückgewinnungsrate beträgt 90, 5%.

3.2.1.7.4 Calcium

Prinzip der Methode:

Das Dialysat einer Milchprobe vermischt sich mit Phthaleinpurpur und reagiert in Gegenwart von Diäthylamin unter Farbbildung, photometrische Messung bei 580 nm (22, 38).

Geräte:

Auto-Analyzer-II-System mit Analyseneinheit für die Calcium-Bestimmung. In den beschriebenen Versuchen simultane Messung von Calcium und Phosphat.

Chemikalien und Reagenzien:

Kochsalzlösung 0, 9% und 0, 5 ml Brij/1

Kaliumcyanid-Diäthylamin-Lösung:

0, 5 g Kaliumcyanid und 37, 5 ml Diäthylamin mit
dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen.

CPC-Lösung:

2, 5 g 8-hydroxychinolin, 0, 07 g Phthaleinpurpur
in konzentrierter Salzsäure und 1 ml Brij mit
dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen

Verdünnungslösung für kontinuierliches Filter:

14 ml 70%ige HClO_4 in 1000 ml dest. Wasser

Calcium-Standard-Lösung:

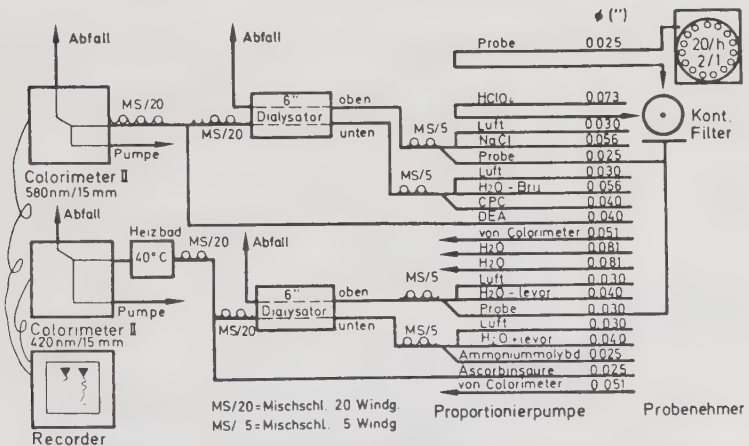
10 000 mg Ca/1000 ml dienen als Ausgangslösung für die
Arbeitsstandards (800, 1200, 1600 mg Ca/1000 ml)

Vorbereitung der Proben:

Keine Probenvorbereitung.

Durchführung der Messung:

Die Durchführung der automatisierten Calciumbestimmung in der kontinuierlichen Durchflußanalyse ist schematisch im oberen Teil des nachstehenden Flußdiagramms dargestellt.



CALCIUM- und PHOSPHAT- Bestimmung in Milch im Autoanalyzer-II-System (Simultane Anzeige auf 2- Kanal-Schreiber)

Abbildung 12

Quantifizierung des Calciumgehaltes in den Milchproben mittels Eichkurve.

Sicherheit der Methode:

Standardabweichung: 1% vom Mittelwert.

Rückgewinnungsrate: 100%.

3.2.1.8 Anionen

Die wichtigsten in der Milch vorkommenden Anionen Chlorid und Phosphat konnten quantitativ in der kontinuierlichen Durchflußanalyse des Auto-Analyzer-II-Systems nachgewiesen werden.

3.2.1.8.1 Chlorid

Prinzip der Methode:

Bei einer Reaktion von Chlorionen mit $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ entsteht nichtionisierendes HgCl_2 , während die SCN -Ionen mit Fe^{+++} -Ionen einen roten Komplex bilden. Messung der Farbintensität bei 480 nm (22, 71).

Geräte:

Auto-Analyzer-II-System mit Analyseneinheit für die Chlorid-Bestimmung.

Chemikalien und Reagenzien:

Chlorid-Farbreagenz:

Im 1000 ml Meßkolben 800 ml einer gesättigten Quecksilber-thiocyanat-Lösung mit Eisennitrat-Lösung auf 1000 ml auffüllen. Das Farbreagenz 24 Stunden stehen lassen.

Vorrats-Chlorid-Lösung:

58,45 g NaCl mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen. Diese Lösung enthält 35,5 g Chlorid.

Arbeits-Standards:

800, 900, 1000, 1100, 1200 mg Cl/1000 ml

Verdünnungslösung für kontinuierliches Filter:

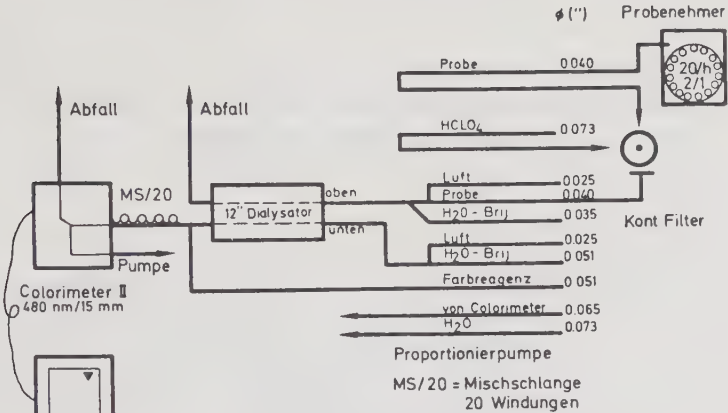
14 ml 70%ige HClO_4 auf 1000 ml mit destilliertem Wasser auffüllen.

Vorbereitung der Proben:

Keine Probenvorbereitung.

Durchführung der Messung:

Der Aufbau des AA-II-Systems zur Bestimmung von Chlorid in Milch ist im Flußdiagramm der Abbildung 13 dargestellt. Die Quantifizierung erfolgt wie üblich an Hand einer Eichkurve, die nach der Standardserie gefertigt wird.



CHLORID - Bestimmung in Milch im Autoanalyser - II - System

76/169 LG

Abbildung 13

Sicherheit der Methode:

Standardabweichung bei Mehrfachbestimmung: 11%

Wiederauffindungsrate: 100%

3.2.1.8.2 Phosphat

Wie bei Calcium (siehe 3.2.1.7.4) bereits erwähnt, simultane Messung von Calcium und Phosphat wegen des gemeinsam benötigten kontinuierlichen Filters auf einer entsprechend ausgerüsteten Analyseneinheit unter Verwendung eines Zwei-Kanal-Schreibers (22, 38).

Prinzip der Methode:

Nach Zugabe von Ammoniummolybdat zum Milchdialysat bildet sich Phosphormolybdänsäure, die durch Ascorbinsäure reduziert wird.

Geräte:

Wie bei 3.2.1.7.4

Chemikalien und Reagenzien:

Ammoniumheptamolybdat-Lösung, 1% in dest. Wasser

Ascorbinsäure-Lösung:

17,6 g L(+)-Ascorbinsäure

50,0 ml Aceton (DAB)

0,5 ml Levor IV

1,0 ml H_2SO_4 (1,86)

dest. Wasser ad 1000 ml

Arbeits-Standards:

8,78 g KH_2PO_4 auf 1000 ml mit dest. Wasser auffüllen

Die Lösung enthält 2000 mg P/1000 ml.

Tages-Standards von 400, 800 und 1200 mg/1000 ml ansetzen.

Vorbereitung der Proben:

Keine Probenvorbereitung

Durchführung der Messung:

Das zu Grunde liegende Flußdiagramm des verwendeten Auto-Analyzer-II-Systems ist in Abbildung 12 dargestellt (siehe 3.2.1.7.4). Die Auswertung der Messungen erfolgt mit einer Eichkurve.

Sicherheit der Methode:

Standardabweichung bei Mehrfachmessungen: bis 2%

Wiederauffindungsrate: 100%

3.2.1.9 Metaboliten

Das physiologische Profil der Milch wird neben den vorstehend besprochenen Parametern auch von Metaboliten des Kohlenhydrat-, Fett- und Eiweißabbaus bestimmt. Pyruvat, Milchsäure, Freie Fettsäuren (FFA) und Ammoniak kommen sowohl als milchoriginäre Bestandteile als auch als Ergebnis eines in der Milch ablaufenden bakteriellen Katabolismus vor. Da die Anamnesewerte einerseits beide Quellen inkludieren, andererseits sehr konstant bleiben, erschien eine Differenzierung der Herkunft nicht erforderlich. Zudem war eine Fixierung der Proben unmittelbar nach der Probenahme aus versuchstechnischen Gründen nicht durchführbar.

3.2.1.9.1 Pyruvat

Prinzip der Methode:

Pyruvat wird in Gegenwart von LDH bei gleichzeitiger Oxydation von NADH_2 zu Milchsäure reduziert. Die verbrauchte NADH_2 -Menge ist dem Pyruvatgehalt proportional. Die Abnahme von NADH_2 wird colorimetrisch bestimmt (54, 55, 61, 67).

Geräte:

Auto-Analyzer-II-System mit Zwei-Kanal-Analyseneinheit
(Blank-System) und Colorimeter mit Referenzkanal für Blank.

Chemikalien und Reagenzien:

Natriumcitrat-Lösung, 5% in dest. Wasser

Tris-Puffer:

72,6 g Tris mit dest. Wasser auf 1800 ml auffüllen,
pH-Wert auf 7,6 mit konz. HCl einstellen und mit
dest. Wasser auf 2000 ml auffüllen

NADH_2 -Vorrats-Lösung:

60 mg NADH_2 -Natriumsalz in 100 ml 1,21%igem
Tris-Puffer lösen

Proben- und Referenz-Reagenz:

50 ml der NADH_2 -Lösung mit dest. Wasser auf 2000 ml
auffüllen, gut durchmischt in zwei Teilen zu 1000 ml
abfüllen. Dem Probenreagenz (1000 ml) 0,6 ml einer
LDH-Suspension (aus Kaninchenmuskel, 5 mg/ml)
zusetzen.

Pyruvat-Vorrats-Lösung:

128 mg Na-Pyruvat in 1000 ml dest. Wasser lösen.

Arbeits-Standards:

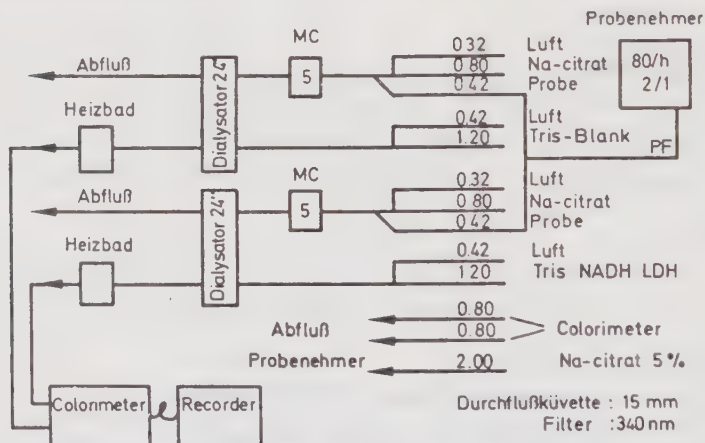
Aus der Vorrats-Lösung Tages-Standards mit Pyruvat-Konzentrationen von 1 - 10 mg/1000 ml herstellen.

Vorbereitung der Proben:

Keine Probenvorbereitung.

Durchführung der Messung:

Die Pyruvat-Messung erfolgt mit hoher Probenfrequenz (80/h) analog dem folgenden Flußdiagramm:



Die colorimetrische Pyruvatbestimmung mit Blank im Auto-Analyzer-System II

75/446 LQ

Abbildung 14

Die Werte werden mittels einer Eichkurve bestimmt.

Sicherheit der Methode:

Standard-Abweichung: 3%

Rückgewinnungsrate: 99%

3.2.1.9.2 L(+) Milchsäure

Prinzip der Methode:

L(+)Laktat wird bei gleichzeitiger Reduktion von NAD in Anwesenheit des Enzyms LDH zu Pyruvat oxydiert (53, 67).

Geräte:

Auto-Analyzer-II-System mit Analyseneinheit
für Milchsäure und Fluorometer

Chemikalien und Reagenzien:

Natriumcitrat-Lösung, 5% in dest. Wasser

Hydrazin/Glycin-Puffer:

45 ml Hydrazinhydroxid (80%ig), 6 g Glycin, 300 ml
dest. Wasser und 10 ml 0,1 M Titriplex III vermischen
und auf pH 9,5 einstellen.

Tris-Puffer:

1,21%ig in dest. Wasser (pH 7,5 mit HCl 32%ig)

Milchsäure-Enzym-Lösung:

0,6 g NAD und 2 ml LDH-Suspension (5 mg/5 ml) mit
Tris-Puffer auf 100 ml auffüllen; täglich frisch bereiten.

Milchsäure-Vorrats-Lösung (1000 mg/1000 ml):

107 mg Lithium-L(+)Laktat in 100 ml dest. Wasser lösen.
Haltbarkeit: Eine Woche

Tages-Standards:

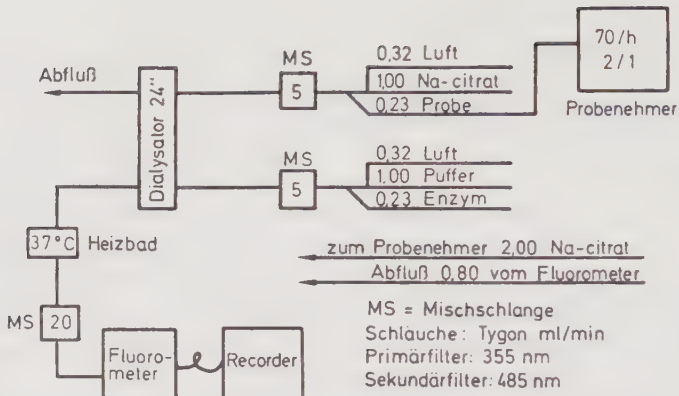
Aus der Vorrats-Lösung Tages-Standards zwischen
10 und 200 mg/1000 ml in dest. Wasser herstellen.

Vorbereitung der Proben:

Keine Probenvorbereitung

Durchführung der Messung:

Der Aufbau des Meßsystems der kontinuierlichen Durchflußanalyse zur Milchsäurebestimmung ist in Abbildung 15 als Flußdiagramm dargestellt:



Enzymatische L(+) - Laktatbestimmung (fluorometrisch) im Auto-Analyzer-System II

VI 76/53f La

Abbildung 15

Mit einer über die Standardhöhen erstellten Eichkurve werden die Werte gemessen.

Sicherheit der Methode:

Standardabweichung: Bis 2%

Rückgewinnungsrate: Quantitativ (100%)

3.2.1.9.3 Freie Fettsäuren (FFA)

Prinzip der Methode:

Die Freien Fettsäuren werden mittels eines Extraktionsgemisches aus der Milchprobe extrahiert und über ein Farbreagenz quantitativ erfaßt (22).

Geräte:

Auto-Analyzer-II-System mit Analyseneinheit für FFA-Bestimmung und geänderten Probenehmer zur Aufnahme von 8 ml-Sovirel-Röhrchen. Gaswaschflasche, verschließbare Sovirel-Röhrchen, Schüttelapparat.

Chemikalien und Reagenzien:

Extraktionsgemisch:

1000 ml Isopropanol

1000 ml Heptan

80 ml Schwefelsäure 4%ig vermengen.

Puffer-Lösung:

2,5 g Natriumbarbitol in einem 100 ml-Meßkolben
mit 50 ml dest. Wasser lösen, 1,0 g Phenolrot
hinzufügen und auf 100 ml mit dest. Wasser auffüllen.
Diese Lösung lichtgeschützt aufbewahren.

Farbreagenz:

5 ml Pufferlösung mit Äthanol (96%) auf
1000 ml auffüllen.

Vorrats-Fettsäure-Lösung (6,24 mÄqu/l):

320 mg Palmitinsäure in 200 ml Heptan lösen.

Ausgangs-Lösung:

20 ml Vorrats-Lösung mit 80 ml Heptan,
100 ml Isopropanol und 8 ml Schwefelsäure (4%ig)
vermengen.

Tages-Standards:

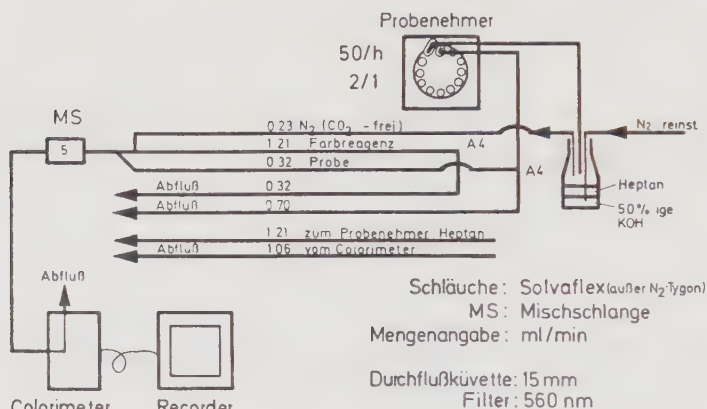
Tages-Standards in Konzentrationen zu 0, 2/0, 4/0, 6/
1, 0/1, 5 und 2, 0 mÄqu/l ansetzen.

Vorbereitung der Proben:

1,5 ml Milch mit 5 ml Extraktionsgemisch in Sovirel-Röhrchen mit Schraub-
verschluß gründlich vermischen, mit Hilfe eines Schüttelapparates die Proben
30 Minuten schütteln und anschließend zur Phasentrennung 30 Minuten stehen
lassen.

Durchführung der Messung:

Die Messung erfolgt im Auto-Analyzer-II-System nach folgendem Schema:



FFA-Bestimmung im Auto-Analyzer System II

75/11/13

Abbildung 16

Die Quantifizierung der Meßwerte erfolgt an Hand einer Eichkurve.

Sicherheit der Methode:

Standard-Abweichung: 4,6%

Rückgewinnungsrate: 95,7%.

3.2.1.9.4 Ammoniak

Prinzip der Methode:

Das aus einem Ammoniumsalz freigesetzte Ammoniak wird in alkalischer Lösung mit einer Aktiv-Chlor-Verbindung zum Chloramin umgesetzt. Dieses bildet zusammen mit einer phenolischen Verbindung einen Indophenolfarbstoff (22).

Geräte:

Auto-Analyzer-II-System mit Analyseneinheit
zur Ammoniak-Bestimmung.

Chemikalien und Reagenzien:

Natriumpolyphosphat-Lösung:

5,0 g Natrium-Hexa-Meta-Phosphat mit
dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen.

Nitroprussidnatrium-Natriumsalicylat-Lösung:

0,6 g Nitroprussidnatrium und
85,0 g Natriumsalicylat mit dest. Wasser auf
1000 ml auffüllen.

Natronlauge 1,2%:

12,0 g Natriumhydroxid (Plätzchen) in
1000 ml dest. Wasser lösen.

Natriumdichlorcyanurat-Lösung:

0,15% Natriumdichlorcyanurat in 100 ml
Natrium-Polyphosphat lösen.

Vorrats-Ammoniak-Lösung:

In einem Meßkolben (1000 ml) 388 mg Ammoniumsulfat
in dest. Wasser lösen und mit dest. Wasser bis zur
Markierung ergänzen.

Tages-Standards:

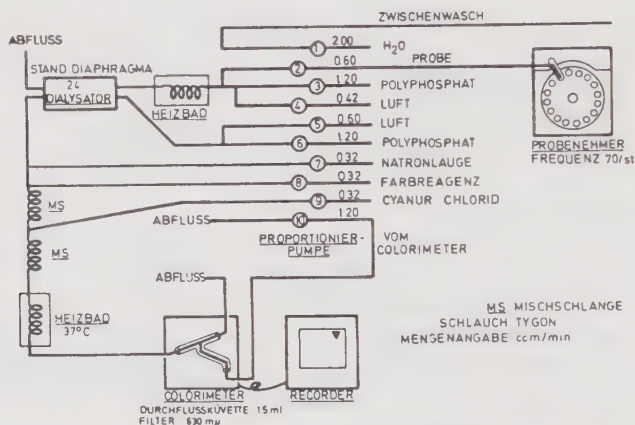
Tages-Standards zur Ammoniak-Bestimmung in
Konzentrationen zu 1 / 5 / 10 und 20 mg/1000 ml
ansetzen.

Vorbereitung der Proben:

Keine Probenvorbereitung.

Durchführung der Messung:

Die colorimetrische Messung bei 610 nm beruht auf einer Farbstoffbildung des aus dem Ammoniak der Probe entstandenen Chloramin. Den Aufbau des Systems zeigt folgende Abbildung:



AMMONIAKBESTIMMUNG IN MILCH IM AUTOANALYZER II SYSTEM

72/003 w

Abbildung 17

Auswertung mit Hilfe einer Eichkurve.

Sicherheit der Methode:

Standardabweichung: 6 %

Rückgewinnungsrate: 102,1%

Die Rückgewinnungsrate zeigt, daß mit dieser Methode neben Ammoniak noch Begleitsubstanzen erfaßt werden.

3.2.2 Prüfung der technologischen Wertigkeit der Milch

Die im internationalen Schrifttum (2.5.1.2) berichteten Störungen bei der Verarbeitung von Milch aus Gebieten, in denen vorher Fasciolose-Behandlungen vorgenommen wurden, ließen es sinnvoll erscheinen, als Primärtest für eine grundsätzliche technologische Eignung der Milch den pH-Wert, die Hemmstofffreiheit und die Labgerinnungsfähigkeit zu prüfen.

3.2.2.1 pH-Wert

Siehe 3.2.1.3

3.2.2.2 Hemmstoffe

3.2.2.2.1 Brillantschwarz-Reduktions-Test

In den Versuchen fand der von GALESLOOT und HASSING (17), sowie von KRAACK und TOLLE (36) entwickelte Brillantschwarz-Reduktions-Test mit dem Testkeim *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* Anwendung, um zu prüfen, ob die in der Milch auftretenden Rückstände des jeweiligen Fasciolizids die Aktivität des Testkeimes hemmen.

Prinzip der Methode:

Die Methode beruht auf der Wachstumshemmung des Testkeimes durch Hemmstoffe, die aus der Milch in den Agar diffundieren. Der zugefügte Redoxindikator zeigt nach einer Inkubation durch Farbumschlag von Blau nach Gelb oder durch Persistieren der blauen Farbe das Ergebnis.

Geräte:

Grundausrüstung eines bakteriologischen Labors

Mikrotiter-Tablets zur rationellen Durchführung des Tests

Reagenzien, Nährmedien und Kultur:

Nährboden:

4,5 g "Antibiotika-Agar" Nr. 1 in 100 ml dest. Wasser kalt lösen; danach Nährmedium 15 Minuten bei 120°C autoklavieren. Abkühlen auf $52^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ und weiter verarbeiten

Testkultur:

Das Lyophilisat ($15,7 \pm 0,3 \times 10^9$ Keime) mit 10 ml sterilem dest. Wasser versetzen und intensiv mischen (Stamm C 953).

Aufbereiten des Reaktionsgemisches:

Die Keimsuspension im Wasserbad auf $52^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ erwärmen und den Agar unter Rühren zugeben. Anschließend 9 mg Brillantschwarz BM in 2 ml Glycerin und 1 ml einer 0,2%igen Manganchlorid-Lösung lösen und nach Erwärmen auf $52^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dem Agar-Keim-Suspensions-Gemisch zusetzen. Das fertige Gemisch mit einer Automatik-Spritze in die Kavitäten des Test-Tabletts füllen und mit einer Klebefolie verschließen.

Vorbereitung der Proben:

Keine Probenvorbereitung.

Durchführung des Hemmstoffnachweises:

Die Klebefolie muß von den Tabletts entfernt und jede Kavität mit 0,1 ml der zu untersuchenden Milch überschichtet werden. Als Positiv-Kontrolle dient ein Penicillin-Standard mit 0,008 I. E. /ml, als negative Kontrolle eine hemmstofffreie Milch. Die mit Milch beschickten Platten unverschlossen für eine Stunde zur Diffusion vorhandener antibiotisch wirksamer Hemmstoffe in den Kühlschrank (4°C) stellen. Die Milch durch Schwenken aus den Tabletts entfernen. Zurückbleibende Milchreste durch Spülen mit dest. Wasser sorgfältig beseitigen. Tabletts auf Fließpapier legen und die getrocknete Oberfläche wieder mit Klebefolie verschließen. Inkubation im Brutschrank bei gesättigter Wasserdampf-atmosphäre und einer Temperatur von $68^{\circ} - 70^{\circ}\text{C}$ über ca. 3 Stunden. Reaktion an der Plattenunterseite ablesen. Hemmstofffreie Milchproben sind am Farbumschlag von blau nach gelb zu erkennen. Alle blaugefärbten Systeme mit mindestens der Intensität des Penicillin-Standards sind als positiv zu bewerten.

Nachweisgrenzen:

Die Nachweisgrenzen liegen für Penicillin bei 0,007 - 0,008 I. E. /ml, für Streptomycin bei $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ und für Chlortetracyclin bei $0,7\text{ }\mu\text{g/ml}$.

3.2.2.2.2 Joghurt-Test

Neben dem oben angeführten Brillantschwarz-Reduktions-Test wird häufig der Joghurt-Test als screening-Test auf Hemmstoffe durchgeführt.

Prinzip der Methode:

Es beruht auf dem Farbumschlag des Indikators Lackmus von blau nach rot nach erfolgter Säuerung nach Joghurt-Kultur-Zugabe und Inkubation (53).

Geräte:

Grundausrüstung eines bakteriologischen Labors.

Reagenzien:

Lackmus-Lösung

Kultur:

Aus Joghurt angezüchtete aktive Kultur auf Magermilch

Vorbereitung der Proben und Durchführung der Messung:

- Milchproben 15 Minuten auf 80°C erwärmen
- auf 42°C herunterkühlen
- 10 ml Milch steril in ein Reagenzglas füllen
- 0,5 ml Lackmus-Lösung und 0,5 ml Joghurt-Kultur zugeben
- leicht schütteln und im Wasserbad bei 42°C bebrüten

Die Milch ist hemmstofffrei, wenn nach maximal 4 Stunden Bebrütungszeit der Farbumschlag des Indikators nach rot erfolgt ist.

3.2.2.3 Labgerinnungszeit

Siehe 3.2.1.4

3.2.2.4 Säuerungsverhalten (Milchsäurebildung)

In einer Versuchsreihe wurde die Milchsäurebildung der zu untersuchenden Milch nach Joghurtkulturzugabe im Verlauf von 4 Stunden in folgenden Zeitintervallen gemessen: 1 / 2 / 2,5 / 3 / 3,5 / und 4 Stunden. Parallel dazu erfolgte die Messung des Pyruvatgehaltes und des pH-Wertes der jeweiligen Probe.

Geräte:

	Siehe 3.2.1.3	pH-Wert
und	3.2.1.9.1	Pyruvat
und	3.2.1.9.2	L(+)Milchsäure

Vorbereitung der Proben:

Die differenzierte Vorbereitung der Proben ist aus nachstehendem Schema ersichtlich:

ARBEITSGÄNGE UND PROBENVORBEREITUNG ZUR PRÜFUNG DES SÄUERUNGSVERHALTENS VON ROHMILCH										
Zeit Std.	°C	Probe	Total- volumen ml	Partial- volumen ml	pH-Wert- Messung	A r b e i t s g ä n g e				Milchsäure- Messung
						Fixierung	Verdünnen	Pyruvat- Messung	Verdünnen	
0	20	Rohmilch	110	10	ja	nein	nein	ja	nein	ja
+ 0,1	20	Rohmilch + 3,5 Vol% Joghurt-Kultur (Kulturmilch)	100	10	"	CCl ₃ COOH	"	ja: aus Überstand	"	ja: aus Überstand
+ 1	42	Kulturmilch	90	10	"	" "	1 : 10 mit dest. H ₂ O	ja	wie Pyruvat	ja
+ 2	42	Kulturmilch	80	10	"	" "	" "	"	1 : 100 mit dest. H ₂ O	"
+ 2,5	42	Kulturmilch	70	10	"	" "	" "	"	" "	"
+ 3	42	Kulturmilch	60	10	"	" "	" "	"	" "	"
+ 3,5	42	Kulturmilch	50	10	"	" "	" "	"	" "	"
+ 4		Kulturmilch	40	10	"	" "	" "	"	" "	"

76/694

Tabelle 3

3.2.3 Analytik der Fasciolizidrückstände in der Milch

Die rückstandsanalytischen Untersuchungen auf Fasciolizide wurden durchgeführt, um parallel zur Erfassung der verschiedenen physiologisch-biochemischen Meßgrößen die Konzentration des applizierten Wirkstoffes in Milch als Projektionshintergrund zu erfassen und mögliche Wechselbeziehungen erkennen zu können. Prinzipiell ließen sich die drei phenolischen Fasciolizide nach einheitlichem Verfahren aus der Milch isolieren und gaschromatographisch nachweisen. Wegen schlechter Reproduzierbarkeit mußten jedoch bis auf die Derivatisierung des gereinigten Endextraktes die Isolations- und Reinigungsschritte der jeweiligen Substanz optimal angepaßt werden (5, 24).

Prinzip der Methode:

Die Isolierung des Rückstandes aus dem Substrat beruht auf einer mehrfachen Verteilungstrennung in flüssiger Phase. Die gaschromatographische Detektion mit Hilfe des ECD basiert auf dem besonders intensiven Ansprechvermögen des ECD auf elektrophile Gruppen in den Molekülen.

Geräte:

Grundausstattung des analytisch-chemischen Labors

Gaschromatograph mit Glassäulen und Elektroneneinfangdetektor

Chemikalien und Reagenzien:

Die in Tabelle 4 aufgeführten Chemikalien und Reagenzien haben als Lösungsmittel der Qualität p. A. zu entsprechen.

Vorbereitung der Proben:

GASCHROMATOGRAPHISCHER NACHWEIS VON FASCIOLIZIDEN IN MILCH				
Wirkstoff Präparations- schritt	BROMPHENOPHOS	NICLOFOLAN	NITROXINIL	OXYCLOZANID
Roheextrakt	Vollmilch gefrier-trocknen und entfetten. Rekonstituierte Magermilch mit Aceton und CHCl_3 ausschütteln	Angesäuerte Vollmilch mit CHCl_3 ausschütteln	Vollmilch mit Boratpuffer und CCl_4 ausschütteln	Vollmilch mit Citronensäure und CHCl_3 ausschütteln
1. Reinigung	Verteilung von Wirkstoff/Verunreinigungen zwischen 0,1 N NaOH/n-Hexan	Verteilung von Wirkstoff/Verunreinigungen zwischen 0,1 N NaOH/ CHCl_3	Alkalische Phase mit konz. HCl ansäuern und mit Benzol extrahieren	Organische Phase mit Boratpuffer ausschütteln
2. Reinigung	Alkal. Phase mit konz. HCl ansäuern und mit n-Hexan ausschütteln	Alkal. Phase mit 1 N HCl ansäuern und mit CHCl_3 ausschütteln	Org. Phase mit Boratpuffer ausschütteln	Alkal. Phase mit Citronensäure ansäuern und mit CHCl_3 extrahieren
3. Reinigung	entfällt	entfällt	Alkal. Phase mit konz. HCl ansäuern und mit CH_2Cl_2 ausschütteln	entfällt
Derivatisierung	n-Hexan eindampfen und mit BSA derivatisieren 70°C/15 min	CHCl_3 eindampfen CH_2N_2 in Äther zugeben 20°C/30 min	CH_2Cl_2 eindampfen CH_2N_2 in Äther zugeb. 20°C/15 min	CHCl_3 eindampfen CH_2N_2 in Äther zugeben 20°C/18-24h
GC	Säule Temperatur	1% OV 225 230°C	1% OV 225 190°C	1% OV 225 215°C
Konz. - Faktor Probe - Endextrakt	4 : 1	25 : 1	10 : 1	10 : 1

Träger des Wirkstoffes

* nur Gas Chrom Q als Trägermaterial

75/101 La

Tabelle 4

Durchführung der Messung:

Die zur Quantifizierung günstigen GC-Bedingungen gehen gleichfalls aus Tabelle 4 hervor. Wegen der relativ komplizierten Probenaufbereitung werden als Standards additiv mit dem jeweiligen Fasciolizid abgestuft kontaminierte (0,5 - 1,0 mg/1000 ml) Milchen analog den Proben aufbereitet. Dieses Verfahren erspart die Bestimmung der Rückgewinnungsrate, die in Abhängigkeit von der Anzahl der durchgeführten Schritte zwischen mindestens 70% (bei zwei Schritten) und mehr als 90% (bei vier Schritten) liegt.

Sicherheit der Methodik:

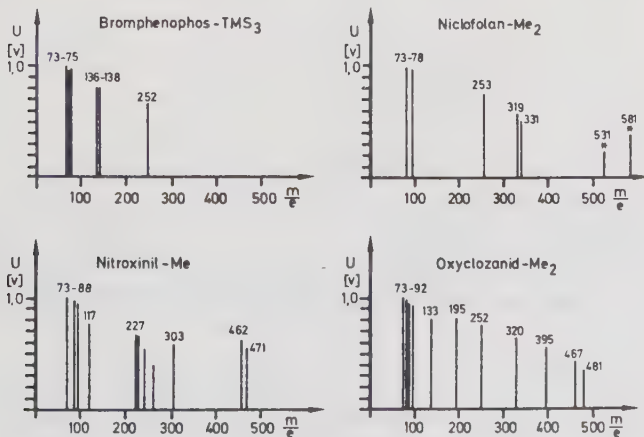
Wenn auch die Aufbereitung der Proben eine gewisse Spezifität beinhaltet, bedürfen die gaschromatographischen Peaks doch der Bestätigung mit einem anderen Verfahren. Hierfür findet die Massenspektrometrie in Koppelung mit der Gaschromatographie Anwendung. Die an den Geräten einzustellenden Parameter weist Tabelle 5 aus:

BEDINGUNGEN FÜR DEN MASSENSPEKTROMETRISCHEN NACHWEIS VON FASCIOLIZIDEN	
Gerät: Varian MAT CH-7 mit Varian Aerograf 1745/1 über 2-stufigen Bieman-Watson-Separator	
GC-Bedingungen:	MS-Bedingungen:
Säule: Pyrex-Glas 1800 x 1,6 mm	Ionenquelle: Elektronenstoßionisation
Füllung: 1 % OV 225 und	Druck bei He-Einstrom: 8×10^{-3} Torr. (korrigiert)
1,5% OV 17 + 1,95% QF 1	Emission: 300 μ A
Gas: Helium 35-37 ml/min	Elektronenenergie: 70 eV
Temperaturen: Injektor: 240°C	Beschleunigung: 3 kV
Säule: 230°C	Registrierung: single scan 21 (10 ² /sec)
GC-MS-Kapillare: 220°C	Totalionenstrom: 0,3 - 3 V
Separator: 210°C	Einzelionenstrom: 0,1/1 V
Schleuse: 200°C	Multipliler: 1,6 kV
	Probemenge: bis 6 μ l eingeeengte Probe

VH76/695La

Tabelle 5

Die typischen Spektren für die vier Fasciolizide zeigt folgende Abbildung:



Vereinfachte Massenspektren der Fasciolizide Bromphenophos, Niclofolan Nitroxinil und Oxyclozanid

VH76/709La

Die Spektren zeigen die für aromatische Verbindungen typischen Basisionen im Bereich m/e 70-80.

Bruchstücke mit höherem Molekulargewicht sind nur schwach ausgeprägt, Molekularionen bei der eingestellten Fragmentierungsenergie von 70 eV nicht zu erhalten. Dennoch sind die Spektren in sich so differenziert, daß die massenspektrometrische Identifizierung von Rückständen mit Hilfe des jeweiligen Referenzspektrums durchführbar ist.

3.3 Ergebnisse

Zur tabellarischen Darstellung

Die Wiedergabe der rund 4 000 Einzelwerte erfolgt nachstehend - der besseren Übersichtlichkeit wegen - tabellarisch.

In diesen Tabellen bedeuten:

- ausgewiesener Einzelwert: arithmetisches Mittel der individuellen Meßgröße der Versuchstiere
- $\bar{X}_A$: arithmetisches Mittel der ausgewiesenen Einzelwerte
- s : Standardabweichung zu $\bar{X}_A$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_i (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

- VK: Variationskoeffizient aus $\bar{X}_A$ und s; Angabe in %

Zur graphischen Darstellung

Die Ergebnisse der Versuche, in denen Kühe mit erhöhten Dosen Niclofolan behandelt wurden, sind graphisch innerhalb eines einheitlichen Rasters dargestellt.

Es beinhalten:

- Abszisse: Zeitachse von vier Tagen vor bis zu acht Tagen nach der Behandlung (X)
- Ordinate: Dimension des Parameters
- Kurvenbild: gleiche Symbolik $\hat{=}$ gleiches Tier

Darüber hinaus veranschaulichen ähnliche Graphiken Veränderungen, die in der tabellarischen Darstellung nicht deutlich hervortreten.

Der folgende Teil gliedert sich für jedes Fasciolizid in die Überbegriffe:

- Physiologisch-biochemisches Profil
- Technologische Wertigkeit
- Rückstandsbildung

3.3.1 Bromphenophos

3.3.1.1 Physiologisch-biochemisches Profil

Orientierende Leistungs- und Gesundheitskriterien

ORIENTIERENDE LEISTUNGS- UND GESUNDHEITSKRITERIEN AUS DEM TAGESGEMELK VOR UND NACH DER APPLIKATION VON BROMPHENOPHOS (Dosis: 12 mg/kg KGW)				
Parameter T a g	Tagesgemelk [kg]	pH-Wert	Fettgehalt [%]	EZZ [1000/ml]
Anamnese 1	17,10	6,55	5,35	308
2	17,07	6,6	6,4	237
3	17,83	6,63	6,58	477
Versuch 1	16,93	6,62	4,63	297
2	16,73	6,63	4,97	198
3	15,9	6,63	5,47	360
4	18,2	6,65	5,87	410
5	16,3	6,63	4,30	-
$\bar{x}_A$	17,33	6,59	6,11	340,67
s Anamnese	0,43	0,04	0,66	123,29
VK	2,48%	0,61%	10,87%	36,19%
$\bar{x}_A$	16,81	6,63	5,05	316,25
s Versuch	0,87	0,01	0,63	91,39
VK	5,19%	0,15%	12,5%	28,9%

Tabelle 6

Die Applikation von Bromphenophos führt zu keiner signifikanten Einbuße der Milchmenge. Am dritten Tag nach der Behandlung fällt das Tagesgemelk der drei behandelten Tiere um 1,4 kg unter den Mittelwert.

Der pH-Wert, der Fettgehalt und die Anzahl somatischer Zellen zeigen keine

Gerinnungsfähigkeit:

Die vergleichbaren Meßwerte eingelabter Milch der drei Versuchstiere waren in jedem Abschnitt individuellen Schwankungen unterworfen. Eine über das Maß dieser Schwankungen hinausreichende Beeinflussung konnte nicht festgestellt werden.

Enzyme:

PARAMETER DES PHYSIOLOGISCH-BIOCHEMISCHEN MILCHSTATUS (ENZYME) VOR UND NACH DER APPLIKATION VON BROMPHENOPHOS (Dosis: 12 mg/kg KGW)			
Parameter T a g	GOT [mU/ml]	GPT [mU/ml]	AP [mU/ml]
Anamnese 1	0,37	0,43	190
2	-	-	220
3	0,3	0,27	267
Versuch 1	0,37	0,23	227
2	0,37	0,23	200
3	0,57	0,17	240
4	0,57	0,23	227
5	0,5	0,2	270
$\bar{X}_A$	0,335	0,35	225,67
s Anamnese	0,05	0,113	38,81
VK	14,78%	32,32%	17,2%
$\bar{X}_A$	0,476	0,212	232,8
s Versuch	0,101	0,027	25,39
VK	21,2%	12,66%	10,91%

Tabelle 7

Vom dritten bis fünften Tag ist ein leichter Anstieg der GOT zu verzeichnen, während die Glutamat-Pyruvat-Transaminase und die Alkalische Phosphatase in der Anamnese- und der Versuchs-Phase konstant bleiben.

Laktose:

Der Milchzuckergehalt fällt am vierten Tag nach der Behandlung auf einen Wert von 4,7% ab. Ein eindeutig behandlungsbedingter Abfall ist jedoch nicht deutlich, zumal über den gesamten Beobachtungszeitraum ein Trend zu niedrigeren Werten festzustellen ist.

PARAMETER DES PHYSIOLOGISCH-BIOCHEMISCHEN MILCHSTATUS (LAKTOSE, KATIONEN, ANIONEN) VOR UND NACH DER APPLIKATION VON BROMPHENOPHOS (Dosis: 12 mg/kg KGW)								
T a g	Parameter	Laktose [%]	Na ⁺ [mg/kg]	K ⁺ [mg/kg]	Mg ⁺⁺ [mg/kg]	Ca ⁺⁺ [mg/kg]	Cl ⁻ [mg/kg]	PO ₄ ³⁻ [mg/kg]
Anamnese	1	5,3	475	1400	123	1115	970	635
	2	5,3	483	1417	118	1073	1053	597
	3	5,2	443	1433	117	1050	973	562
Versuch	1	5,1	443	1367	110	1087	1013	620
	2	5,2	463	1467	122	1087	1070	620
	3	4,9	470	1467	113	1137	1073	647
	4	4,7	453	1400	110	1043	1080	620
	5	4,9	523	1433	115	1077	1100	627
$\bar{x}_A$		5,27	467	1416,67	119,33	1079,33	998,67	598
s Anamnese		0,06	21,17	16,50	3,22	32,96	47,08	36,51
VK		1,1%	4,53%	1,16%	2,69%	3,05%	4,71%	6,11%
$\bar{x}_A$		4,96	470,4	1426,8	114	1086,2	1067,2	626,8
s Versuch		0,195	31,13	43,49	4,95	33,66	32,48	11,69
VK		3,93%	6,62%	3,05%	4,34%	3,1%	3,04%	1,87%

Tabelle 8

Kationen/Anionen:

Die Kationen- und Anionen-Konzentration vor und nach der Behandlung schwankt relativ eng um die Mittelwerte. Ein Einfluß von Bromphenophos auf die Meßgrößen ist nicht vorhanden.

Metaboliten:

PARAMETER DES PHYSIOLOGISCH-BIOCHEMISCHEN MILCHSTATUS (METABOLITEN) VOR UND NACH DER APPLIKATION VON BROMPHENOPHOS (Dosis: 12 mg/kg KGW)					
Parameter T a g		Pyruvat [mg/kg]	L(+)-Laktat [mg/kg]	FFA [mÄqu/l]	NH ₃ [mg/kg]
Anamnese	1	1,1	12,0	0,30	3,95
	2	1,1	9,7	0,30	3,47
	3	1,3	9,3	0,44	3,60
Versuch	1	0,8	9,0	0,28	3,13
	2	0,7	11,0	0,31	4,67
	3	0,9	11,0	0,3	3,57
	4	0,8	11,0	0,36	2,97
	5	1,1	16,0	0,31	3,60
$\bar{x}_A$		1,17	10,33	0,35	3,67
s Anamnese		0,12	1,46	0,08	0,25
VK		9,87%	14,11%	23,09%	6,76%
$\bar{x}_A$		0,86	11,6	0,312	3,59
s Versuch		0,15	2,61	0,03	0,66
VK		17,6%	22,48%	9,45%	18,49%

Tabelle 9

Nach Tabelle 9 ist am fünften Tag post applicationem ein Anstieg der L(+)-Milchsäure zu erkennen. Desgleichen steigt der Ammoniak-Gehalt am zweiten Tag nach der Behandlung an. Diese beiden punktuellen Veränderungen lassen keinen Schluß auf eine Abhängigkeit von der Applikation zu.

3.3.1.2 Technologische Wertigkeit

pH-Wert und Gerinnungsfähigkeit:

Die Ergebnisse sind vorstehend dargestellt (siehe 3.3.1.1).

Hemmstoffnachweis:

Sekretorische Bromphenophos-Rückstände beeinträchtigen das Wachstum des Testkeimes nicht.

Auch im Joghurt-Test wurde die Aktivität der Kultur nicht beeinflusst.

3.3.1.3 Rückstandsbildung

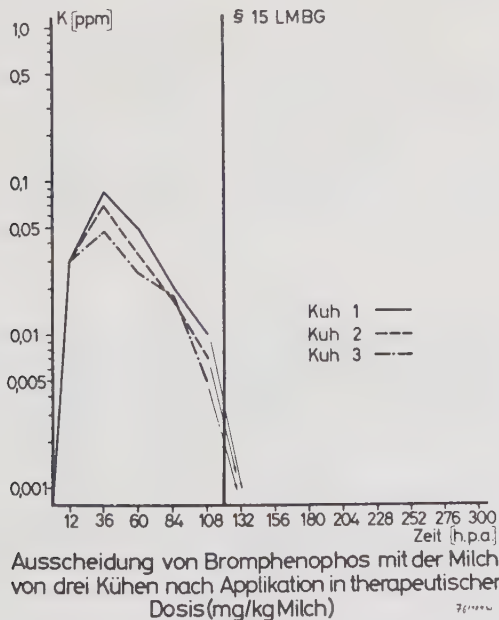


Abbildung 19

Trotz der hohen Dosierung von 12 mg/kg, entsprechend 5.400 mg/Tier, zeigt Bromphenophos nach 36 Stunden nur eine maximale Peak-Konzentration von 0,08 ppm/Milchbasis, die nicht persistiert. Nach 120 Stunden liegen die Werte um 0,007 ppm, während sie sich nach weiteren 60 Stunden bereits unter der Nachweisgrenze bewegen. Die Versuchstiergruppe reagierte in der Ausscheidung weitgehend gleichsinnig.

3.3.2 Niclofolan (therapeutische Dosis)

3.3.2.1 Physiologisch-biochemisches Profil

Orientierende Leistungs- und Gesundheitskriterien

ORIENTIERENDE LEISTUNGS-UND GESUNDHEITSKRITERIEN AUS DEM TAGESGEMELK VOR UND NACH DER APPLIKATION VON NICLOFOLAN (Dosis: 3 mg/kg KGW)				
Parameter T a g	Tagesgemelk [kg]	pH-Wert	Fettgehalt [%]	EZZ [1000/ml]
Anamnese 1	15,17	6,68	4,60	280
2	14,8	6,60	4,18	220
3	16,4	6,80	-	538
4	16,8	6,64	-	327
Versuch 1	16,33	6,80	4,78	290
2	16,20	6,86	5,39	470
3	15,53	6,77	4,50	210
4	14,87	6,75	5,4	397
5	12,37	6,77	3,65	990
6	13,6	-	-	-
7	13,7	6,69	4,01	782
8	12,7	6,73	4,83	-
9	13,43	6,64	4,89	-
$\bar{x}_A$	15,79	6,68	4,39	341,25
s Anamnese	0,96	0,09	0,30	138,28
VK	6,07%	1,29%	6,77%	40,52%
$\bar{x}_A$	14,3	6,75	4,69	523,17
s Versuch	1,48	0,067	0,62	302,03
VK	10,33%	1,0%	13,16%	57,73%

76/799

Tabelle 10

Das Tagesgemelk sinkt nach der Applikation ständig ab, wobei der Tiefstwert von 2 kg Milch unter dem Mittelwert nach acht Tagen erreicht wird.

Der pH-Wert der Milch zeigt einen deutlichen Trend zur Alkalisierung. Der höchste Wert ist am zweiten Tag nach der Behandlung mit Niclofolan erreicht. Erst am siebten Tag p.a. sind wieder Normalwerte festzustellen.

Dieses Ergebnis konnte in einem weiteren Versuch mit einer Bestandsbehandlung erhärtet werden (durchgezogene Linie). Die Kontrollgruppe zeigt keine Veränderungen (unterbrochene Linie).

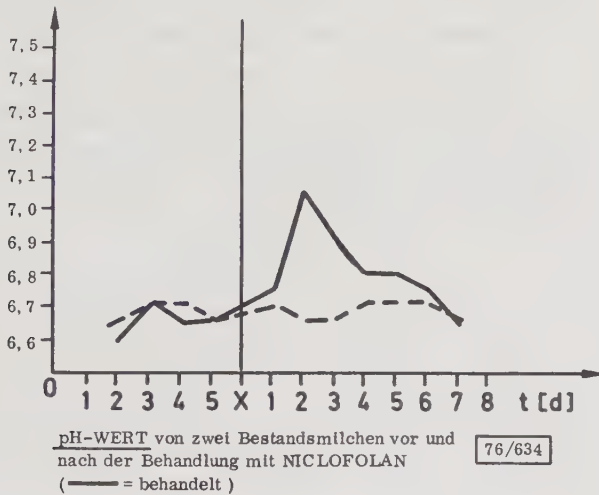
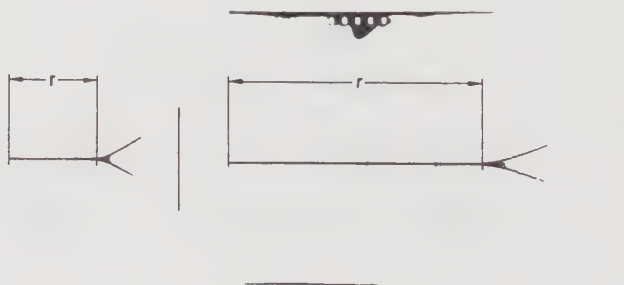


Abbildung 20

Aus Tabelle 10 ist für den Fettgehalt und die Anzahl somatischer Zellen, die vor und nach der Applikation erhebliche Schwankungen aufweisen, keine Niclofolan-bedingte Veränderung zu ersehen.

Gerinnungsfähigkeit:

Das thrombelastographische Gerinnungs- und Verfestigungsverhalten eingelabter Milchen der Versuchstiere vor und nach der Applikation von Niclofolan zeigt erhebliche, allerdings individuell verschiedene Verlängerungen der Gerinnungs- und Verfestigungszeiten. Diese Veränderungen lassen sich bei den einzelnen Tieren bis zu acht Tagen nach der Behandlung nachweisen. Bei der Betrachtung des Gerinnungsverhaltens von Sammelmilchen vor und 48 Stunden nach der Behandlung ergeben sich gleichsinnige Verhältnisse, die in der folgenden Abbildung deutlich in Erscheinung treten.



THROMB - ELASTOGRAMM einer Milchgallerte aus einer Bestandsmilch von 45 Kühen vor (links) und nach (rechts) der Behandlung mit NICLOFOLAN (r = Gerinnungszeit)

76/139La

Abbildung 21

Die Hartkäseherstellung aus diesen Sammelmilchen zeigte neben einer verzögerten Labgerinnungszeit der Milch p.a. eine um 10% verminderte Käseausbeute im Vergleich zum Kontrollkäse.

Bei der organoleptischen Untersuchung erhielten beide Käse (I = Kontrolle; II = Versuch) annähernd gleiche Noten:

	Äußeres	Inneres	Geruch	Geschmack	Konsistenz
I	5	5	5	4	5
II	5	4	5	5-	5

Enzyme:

Tabelle 11 weist in der Anamnesephase relativ hohe Transaminasenwerte auf, die während der Versuchsphase auf annähernd physiologische Werte zurückkehren.

PARAMETER DES PHYSIOLOGISCH-BIOCHEMISCHEN MILCHSTATUS (ENZYM) VOR UND NACH DER APPLIKATION VON NICLOFOLAN (Dosis: 3 mg/kg KGW)				
Parameter T a g		GOT [mU/ml]	GPT [mU/ml]	AP [mU/ml]
Anamnese	1	-	-	157
	2	0,93	0,63	148
	3	0,63	1,0	193
	4	1,63	1,27	170
Versuch	1	0,43	0,3	150
	2	0,53	0,47	125
	3	0,47	0,53	117
	4	0,33	0,30	167
	5	1,20	0,47	143
$\bar{x}_A$		1,06	0,97	167
s Anamnese		0,51	0,32	19,55
VK		48,41%	33,12%	11,7%
$\bar{x}_A$		0,59	0,41	140,4
s Versuch		0,35	0,11	19,95
VK		58,91%	26,08%	14,21%

76/805

Tabelle 11

Alkalische Phosphatase fällt bis zum dritten Tag nach der Behandlung mit Niclofolan auf ein Minimum ab und steigt anschließend wieder auf die Anamnesewerte an.

Laktose:

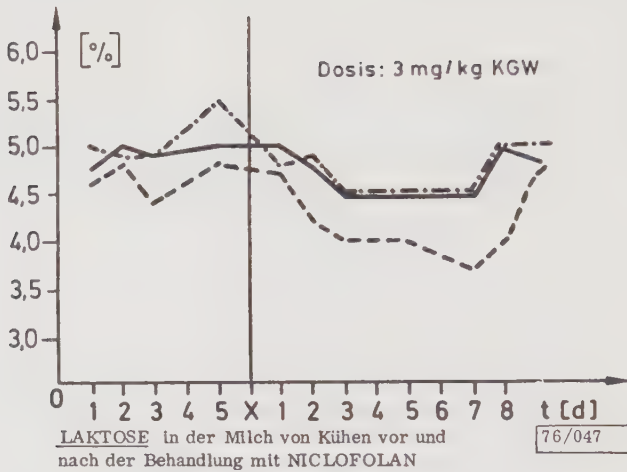


Abbildung 22

Der Laktosegehalt um einen Mittelwert von 4,88% während der Anamnese fällt nach der Behandlung mit Niclofolan auf ein Minimum von 4,23% am siebten Tag p.a.

PARAMETER DES PHYSIOLOGISCH-BIOCHEMISCHEN MILCHSTATUS (LAKTOSE, KATIONEN, ANIONEN) VOR UND NACH DER APPLIKATION VON NICLOFOLAN (Dosis: 3 mg/kg KGW)								
Parameter	Laktose [%]	Na ⁺ [mg/kg]	K ⁺ [mg/kg]	Mg ⁺⁺ [mg/kg]	Ca ⁺⁺ [mg/kg]	Cl ⁻ [mg/kg]	PO ₄ ³⁻ [mg/kg]	
Tag								
Anamnese	1	4,8	450	1650	98,3	1160	1120	623
	2	4,9	430	1633	103,3	1217	1103	690
	3	4,73	567	1600	103,3	1153	1233	633
	II	5,1	500	1600	110	1167	1150	717
Versuch	1	4,83	487	1767	103,3	1100	1230	710
	2	4,63	460	1850	113,3	1967	1243	707
	3	4,33	560	1717	115	1080	1333	767
	4	4,33	517	1550	117	-	1243	-
	5	4,33	597	1600	110	1133	1333	767
	6	-	-	-	-	-	-	-
	7	4,23	633	1333	110	1200	1340	727
	8	4,67	617	1450	118,3	-	1323	-
	9	4,83	513	1467	113,3	-	1217	-
$\bar{x}_A$		4,88	486,75	1620,75	103,73	1174,25	1151,5	665,75
s Anamnese		0,16	61,07	24,95	4,80	29,07	57,7	45,15
VK		3,3%	12,55%	1,54%	4,63%	2,48%	5,01%	6,76%
$\bar{x}_A$		4,52	550,5	1591,75	112,53	1300	1282,75	735,6
s Versuch		0,25	59,78	176,28	4,76	386,74	53,74	29,66
VK		5,41%	10,86%	11,07%	4,23%	29,75%	4,19%	4,03%

Tabelle 12

Kationen/Anionen:

Der Natriumgehalt der Milch steigt vom dritten bis achten Tag p.a. stark an;

Der Maximalwert liegt am siebten Tag um 20% über dem Mittelwert ($\bar{x}_A$).

Unmittelbar nach der Behandlung steigt die Kaliumkonzentration mit einem gemessenen Höchstwert von 1.850 mg/kg am zweiten Tag nach der Behandlung mit Niclofolan.

Ähnlich wie der Kaliumgehalt nimmt auch der Magnesiumgehalt der Milch zu, nur sind die höchsten Werte am vierten und achten Tag nach der Behandlung gemessen worden.

Die Calciumionenkonzentration zeigt bei geringgradiger Erniedrigung am zweiten und dritten Tag nach der Behandlung einen weitgehend stabilen Verlauf.

Unter Berücksichtigung der auch in der Anamneseperiode schwankenden Chloridwerte läßt sich p.a. ein ausgeprägter Anstieg feststellen.

Aus den erhobenen Befunden für Phosphat ergibt sich ein Anstieg am dritten und fünften Tag.

Metaboliten:

PARAMETER DES PHYSIOLOGISCH-BIOCHEMISCHEN MILCHSTATUS (METABOLITEN) VOR UND NACH DER APPLIKATION VON NICLOFOLAN (Dosis: 3 mg/kg KGW)					
Parameter T a g		Pyruvat [mg/kg]	Laktat [mg/kg]	FFA [mmol/l]	NH ₃ [mg/kg]
Anamnese	1	1,5	16,7	0,35	3,1
	2	16,3	10,7	0,33	2,7
	3	-	-	-	-
	4	2,37	20,7	0,34	3,67
Versuch	1	1,37	14,3	0,29	4,57
	2	1,50	19	0,38	5,43
	3	1,20	15	0,41	4,33
	4	1,43	18,7	0,41	4,27
	5	1,80	32	0,37	5,17
	6	-	-	-	-
	7	1,83	26,3	0,33	4,33
	8	1,3	19	0,33	3,53
	9	1,13	13,7	0,31	3,83
$\bar{x}_A$		1,83	16,03	0,34	3,16
s Anamnese		0,47	5,03	0,01	0,49
VK		25,64%	31,4%	2,94%	15,43%
$\bar{x}_A$		1,45	19,75	0,35	4,43
s Versuch		0,26	6,37	0,05	0,63
VK		17,74%	32,25%	12,95%	14,23%

76/811

Tabelle 13

Pyruvat zeigt bei den Einzeltieren keine behandlungsbedingte Veränderung. Dagegen ist ein deutlicher Anstieg der Konzentration am zweiten und dritten Tag p.a. in einer Bestandsmilch festzustellen. Der Kontrollbestand weist kaum Veränderungen auf. In der Bestandsmilch sind jedoch interkurrierende bakterielle Prozesse nicht mit Sicherheit auszuschließen.

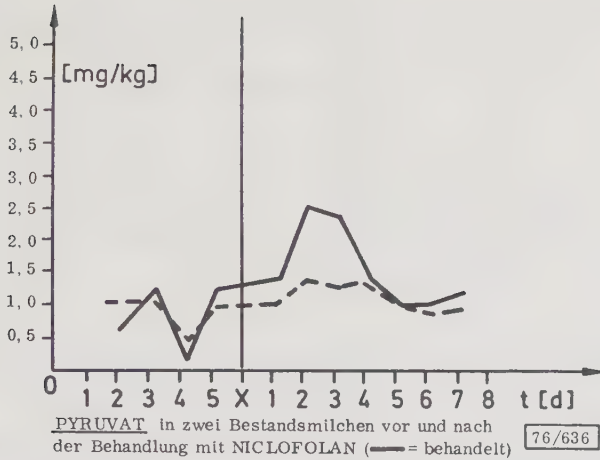


Abbildung 23

Der Milchsäuregehalt zeigt gegenüber undeutlichen Verhältnissen vor und nach der Applikation bei Einzeltieren deutliche Veränderungen in der Herdensammel-milch eines behandelten Bestandes. Jedoch können auch hier als Ursache mikro-bielle Prozesse nicht ausgeschlossen werden. Der Kontrollbestand weist dagegen kaum Veränderungen auf.

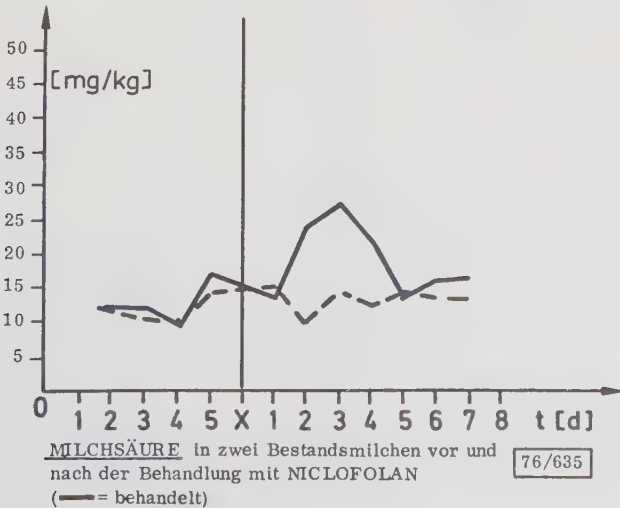


Abbildung 24

Der Anstieg der Freien Fettsäuren vom zweiten bis vierten Tag p.a. ist gering.

Ammoniak erscheint unmittelbar nach Niclofolan-Applikation erhöht; am achten Tag ist das Anamneseniveau wieder erreicht (Tabelle 13).

3.3.2.2 Technologische Wertigkeit

pH-Wert und Gerinnungsfähigkeit:

Die Einflüsse einer Behandlung mit Niclofolan auf den pH-Wert und die Gerinnungsfähigkeit der Milch sind unter 3.3.2.1 beschrieben.

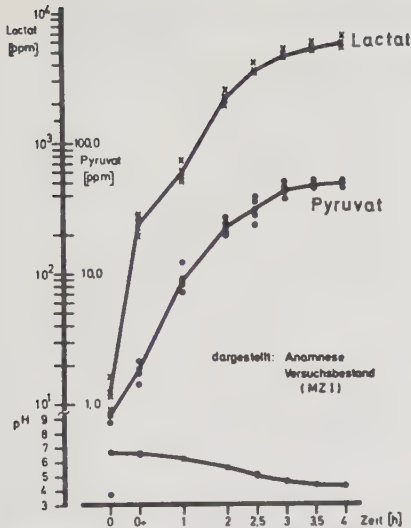
Hemmstoffnachweis:

Sekretorische Rückstände von Niclofolan beeinträchtigen das Wachstum des Testkeimes *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* nicht.

Säuerungsverhalten:

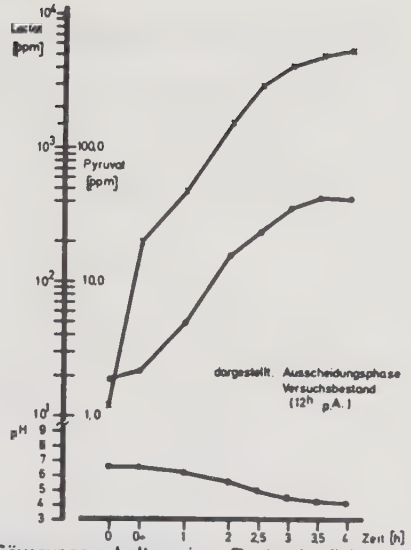
In einem umfangreichen Versuch wurde nach der Behandlung eines Bestandes die Säuerungsfähigkeit der Herdensammelmilch in einem Zeitraum zwischen 12 und 144 Stunden p.a. geprüft und in Beziehung zu den entsprechenden Werten eines Kontrollbestandes gesetzt.

Auf den folgenden vier Abbildungen sind die Anamnesewerte für pH-Wert, Pyruvat und L(+)Milchsäure und die entsprechenden Werte 12, 36 und 144 Stunden p.a. zusammengefaßt.



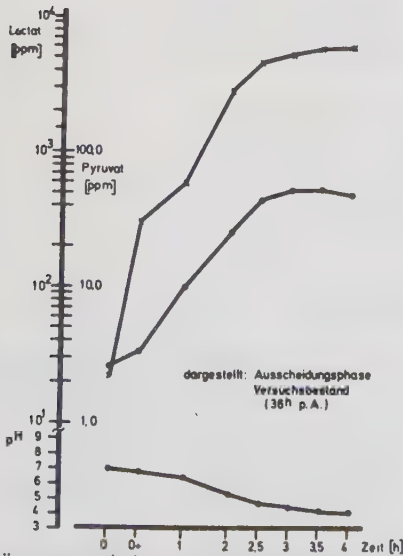
Säuerungsverhalten einer Bestandsmilch nach Zugabe von Joghurtkultur (aus Handelsprodukt)

VF 78/561a



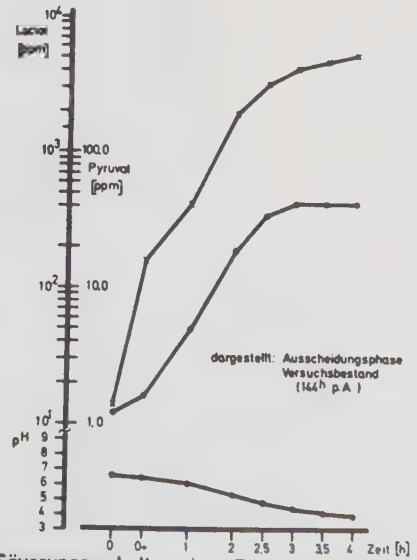
Säuerungsverhalten einer Bestandsmilch nach Zugabe von Joghurtkultur (aus Handelsprodukt)

VF 78/621a



Säuerungsverhalten einer Bestandsmilch nach Zugabe von Joghurtkultur (aus Handelsprodukt)

VF 78/661a



Säuerungsverhalten einer Bestandsmilch nach Zugabe von Joghurtkultur (aus Handelsprodukt)

VF 78/671a

36 Stunden p.a. läßt sich eine verminderte Milchsäurezunahme (Inkubation 1 Stunde, 42°C) feststellen. Abgesehen hiervon treten nach der Behandlung mit Niclofolan keine wesentlichen Veränderungen auf.

3.3.2.3 Rückstandsbildung

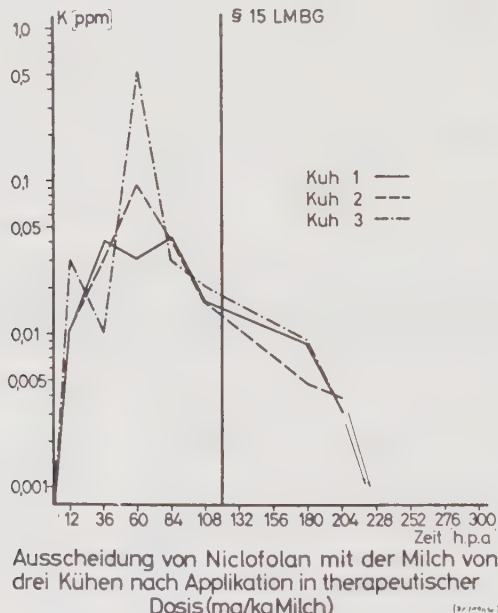


Abbildung 26

Die Ausscheidung der Originärsubstanz mit der Milch kulminiert nach 36-60 Stunden. Die Einzelwerte zeigen Peak-Konzentrationen zwischen 0,04 und 0,52 mg/kg. 120 Stunden nach der Behandlung sind Rückstände in der Größenordnung von 0,015 mg/kg nachweisbar. 204 Stunden p.a. liegen die Rückstands-Konzentrationen unter der Nachweisgrenze.

Einen ähnlichen Verlauf zeigen Rückstände in einer Bestandsmilch (siehe Abbildung 27):

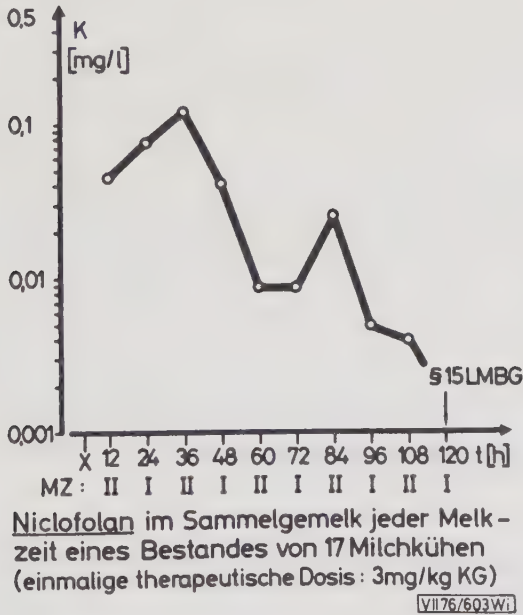


Abbildung 27

3.3.3 Niclofolan (erhöhte Dosis)

Nachdem sich gegenüber therapeutischen Dosen bei erhöhter Dosierung eindeutige Veränderungen zeigten, wurde ein zweiter Versuch zur Bestätigung der gefundenen Ergebnisse durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 28 - 64 dargestellt.

Erklärung der Symbole:

- | | |
|-------------------------|---|
| Unterbrochene Linie | = Kontrolltier (Dosis 0) |
| Strich-punktierte Linie | = Tier mit 1, 5-facher Dosis (4, 5 mg/kg KGW) |
| Durchgezogene Linie | = Tier mit 2, 25- " " (6, 75mg/kg KGW) |

3.3.3.1 Physiologisch-biochemisches Profil

Tagesgemelk:

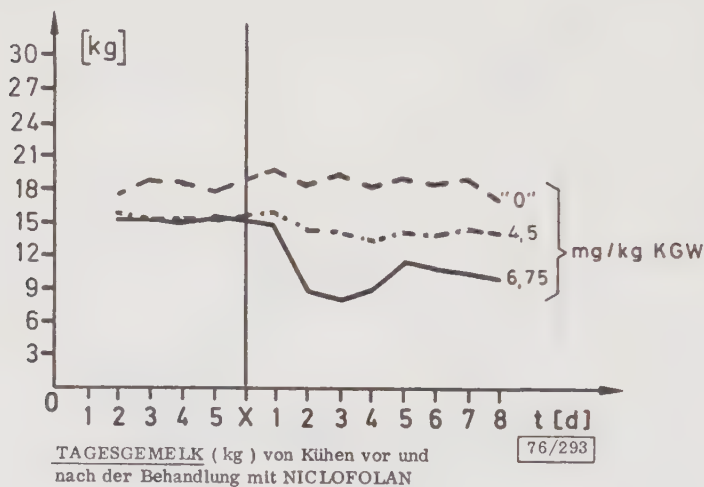


Abbildung 28

Die Milchmengenleistung fällt nach der Applikation mit steigender Dosis ab.

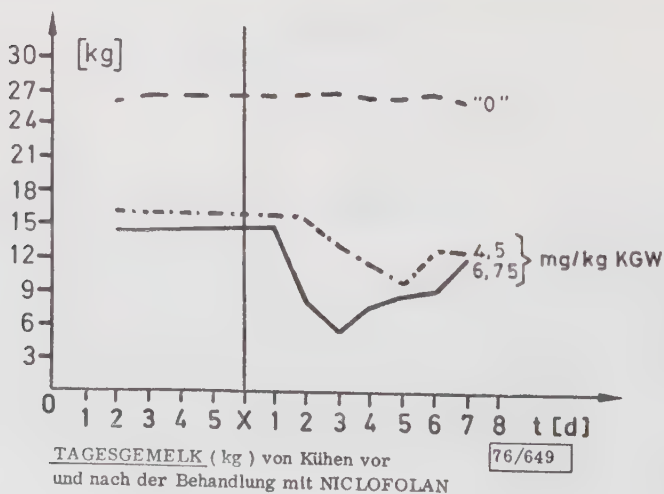


Abbildung 29

Der Rückgang der Milchleistung ist absolut und relativ in Tabelle 14 ausgewiesen.

BEEINFLUSSUNG DER TÄGLICHEN MILCHMENGE (kg) NACH APPLIKATION VON NICLOFOLAN IN VERSCHIEDEN HOHEN DOSEN						
Anamnese (Δ 100 %)	Kontrolle		1.5-fache Dosis		2.25-fache Dosis	
	1. Versuch	2. Versuch	1. Versuch	2. Versuch	1. Versuch	2. Versuch
	18.03	26.45	15.15	17.35	15.05	14.20
Ausscheidungsphase	18.31	26.63	14.14	13.31	10.35	9.44
Differenz kg	+0.28	+0.18	-1.01	-4.04	-4.70	-4.76
%	+2.0	+0.7	-6.7	-23.3	-31.2	-33.5
$\bar{x}_A$ [%]	+1.35		-15.0		-32.35	

VII 76/712 La

Tabelle 14

pH-Wert:

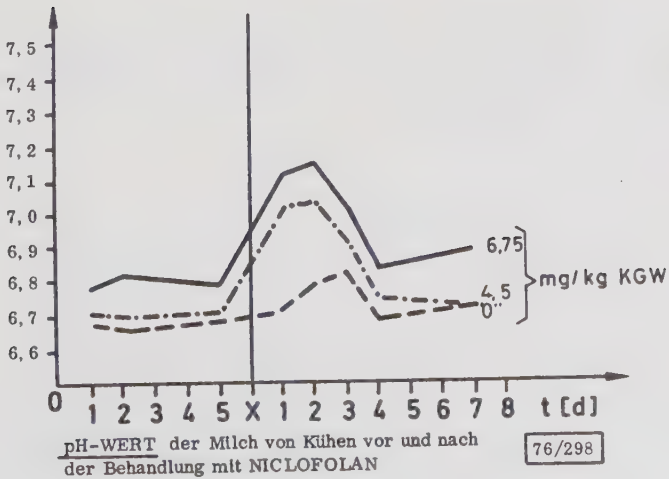


Abbildung 30

Die beiden behandelten Tiere zeigen in Abhängigkeit von der applzierten Dosis einen ausgeprägten Anstieg des pH-Wertes. Diese Beobachtung konnte in einem weiteren Versuch bestätigt werden (siehe Abbildung 31).

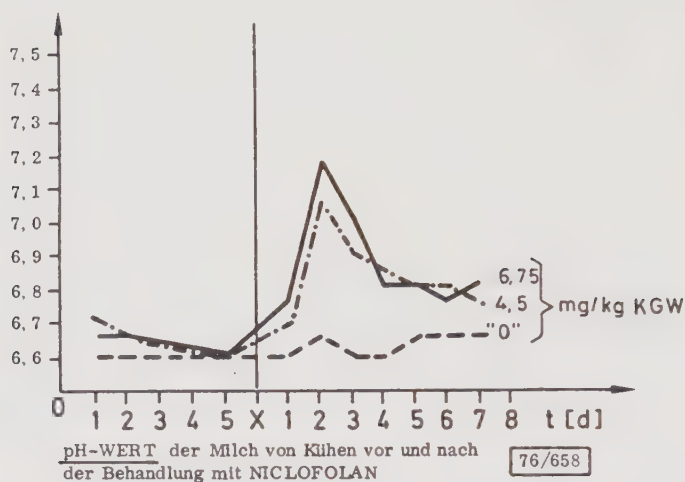


Abbildung 31

Gerinnungsverhalten:

Die Labgerinnungs- und Verfestigungszeiten unterlagen nach der Applikation erheblichen individuellen Schwankungen. Insgesamt gesehen war dennoch eine Verlängerung festzustellen.

Fettgehalt:

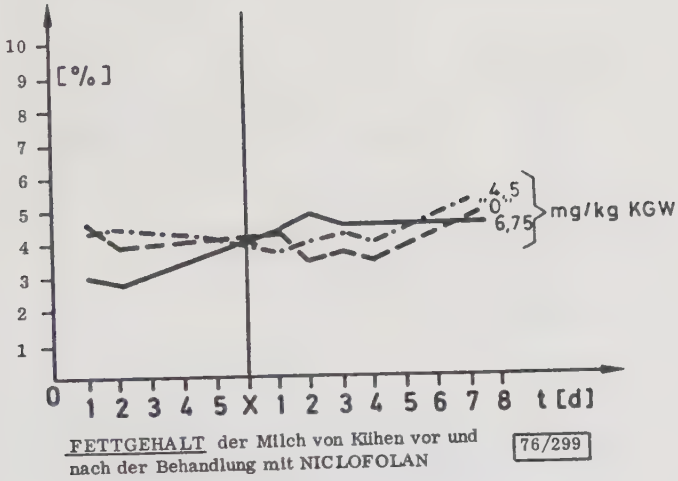


Abbildung 32

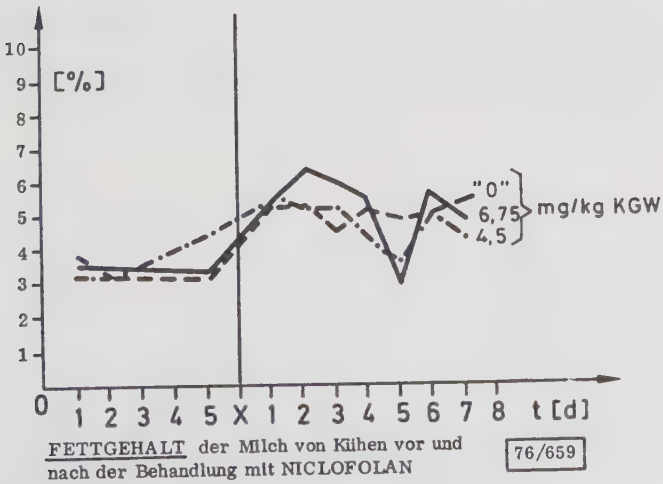


Abbildung 33

Die sich im ersten Versuch abzeichnende Zunahme des Milchfettgehaltes wird im zweiten Versuch bestätigt (siehe Abbildung 32 und 33).

Anzahl somatischer Zellen:

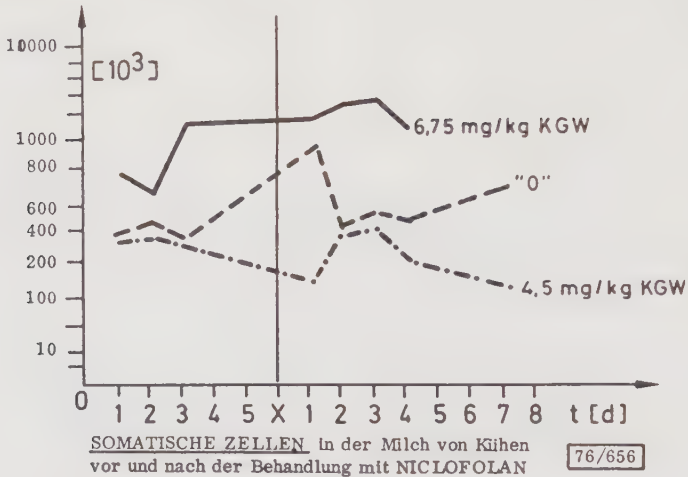


Abbildung 34

Das unterschiedliche Ausgangsniveau läßt den Verlauf der Kurven nach der Behandlung nicht klar hervortreten. Dennoch deutet sich am zweiten und dritten Tag p. a. ein Anstieg der somatischen Zellen an. Bei Kühen mit einem sehr niedrigen Ausgangsniveau ist dieses ausgeprägter vorhanden (Abbildung 35).

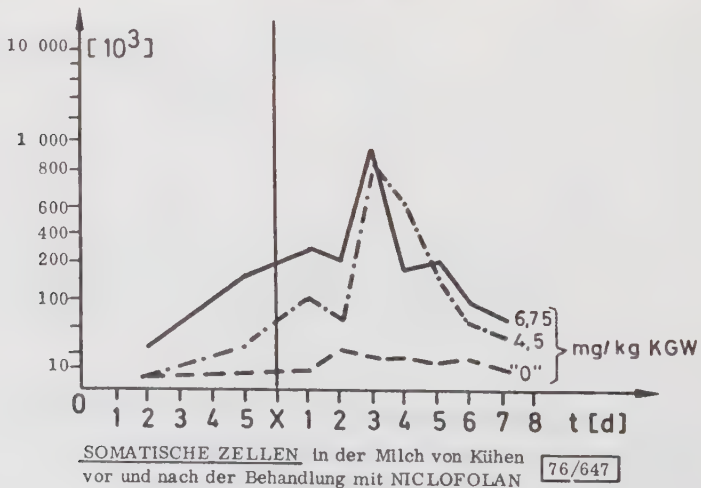


Abbildung 35

Glutamat-Oxalacetat-Transaminase:

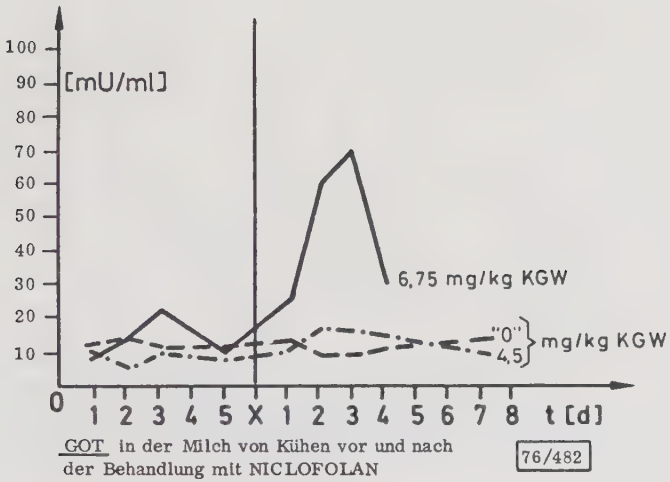


Abbildung 36

Besonders eindrucksvoll zeigt sich nach 2, 25-facher Dosierung von Niclofolan der Anstieg der GOT mit Werten bis zum Siebenfachen des Ausgangsniveaus.

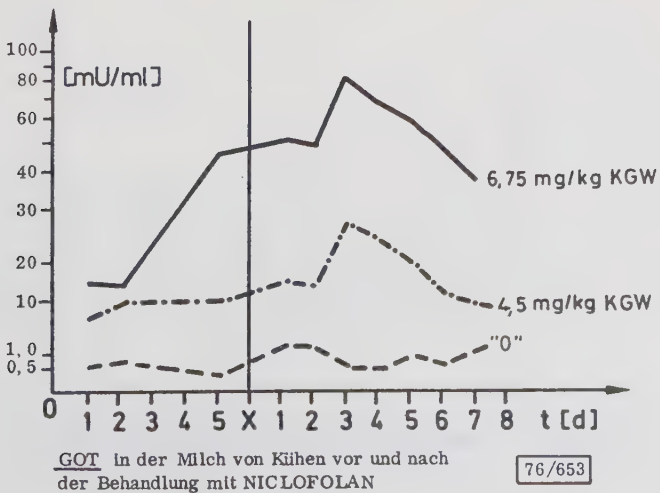


Abbildung 37

Glutamat-Pyruvat-Transaminase:

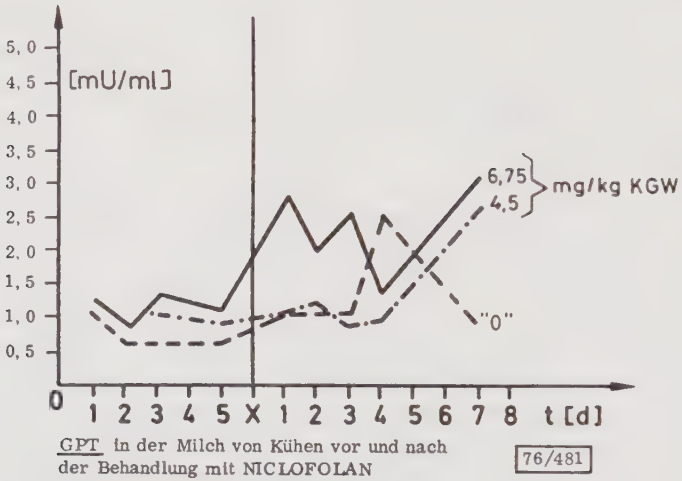


Abbildung 38

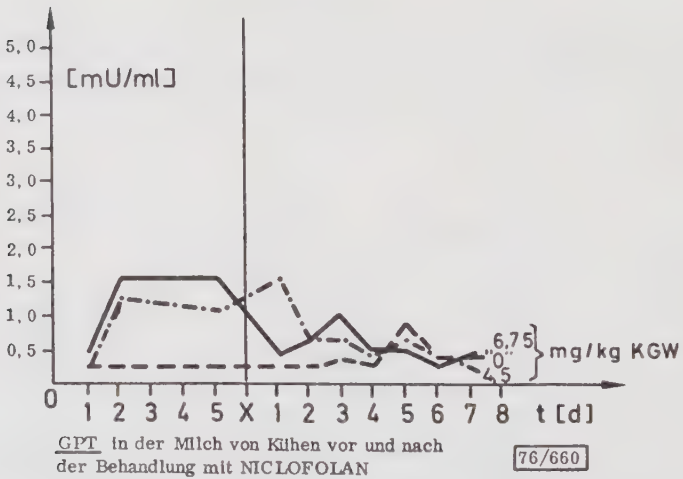


Abbildung 39

Der Anstieg der GPT in der Milch der Kuh mit hoher Dosis aus dem ersten Versuch konnte im zweiten Versuch nicht reproduziert werden (siehe Abbildung 38 und 39).

Alkalische Phosphatase:

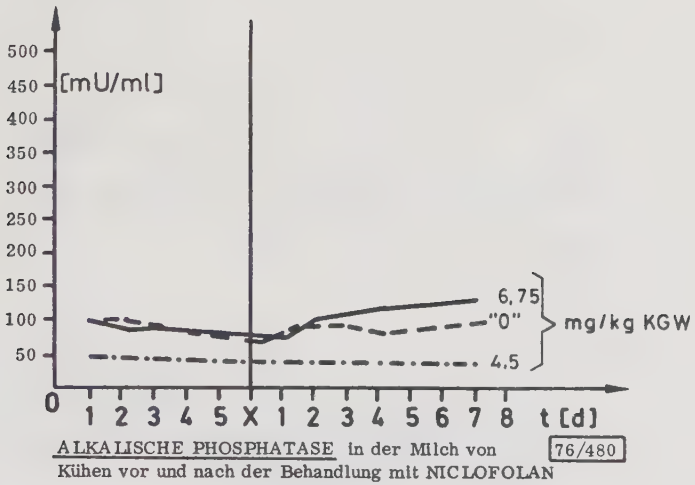


Abbildung 40

Alkalische Phosphatase steigt nach 2, 25-facher Dosis merklich an. Der Anstieg ist bei der niedrigen Dosis kaum ausgeprägt. Die Wiederholung des Versuchs bestätigt diese Beobachtungen (Abbildung 41).

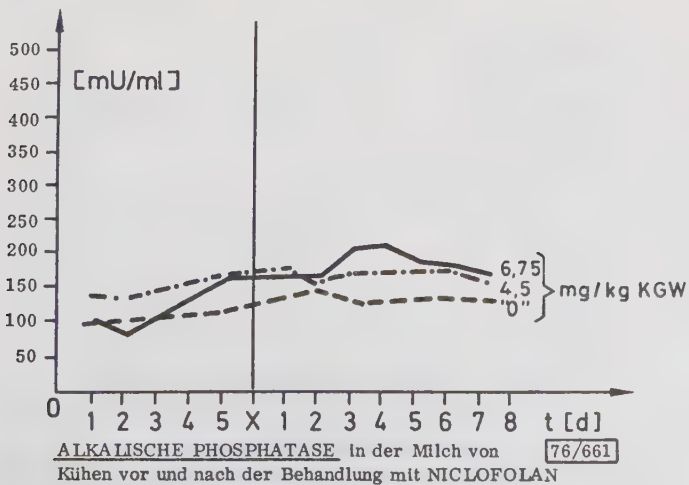


Abbildung 41

Laktose:

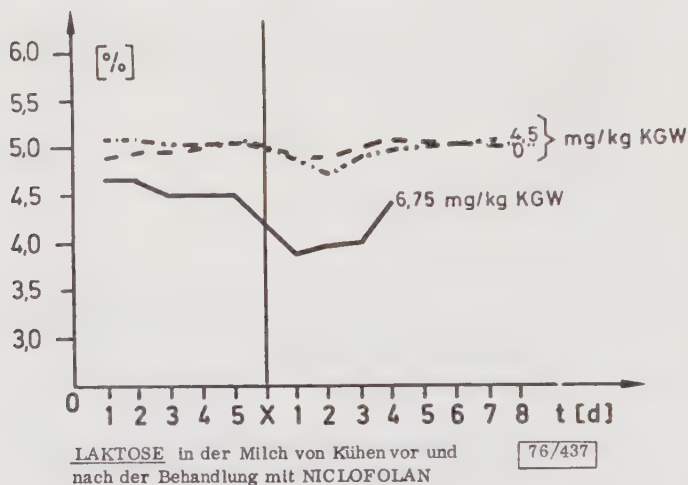


Abbildung 42

Laktose - ein zur Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts relativ konstanter Parameter - reagiert auf beide Dosierungen mit einer ausgeprägten Erniedrigung der Werte.

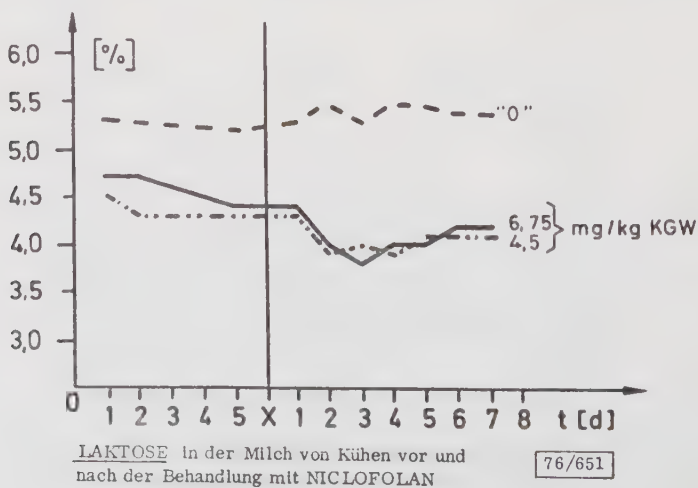


Abbildung 43

Natrium:

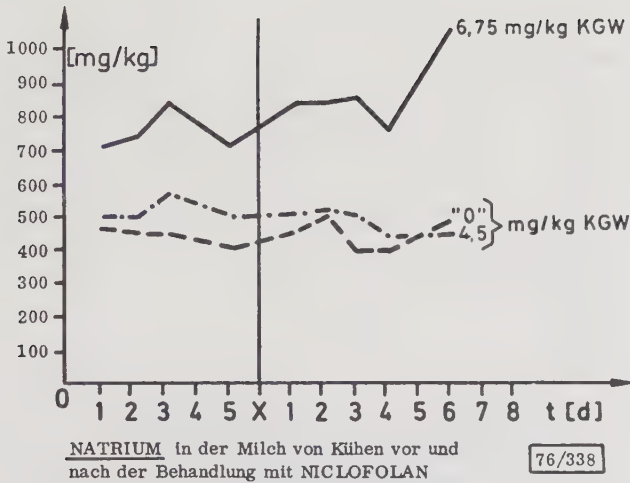


Abbildung 44

Im ersten Versuch ist bei dem Tier, das mit dem 2, 25-fachen der therapeutischen Dosis behandelt wurde, ein leichter Anstieg zu beobachten.

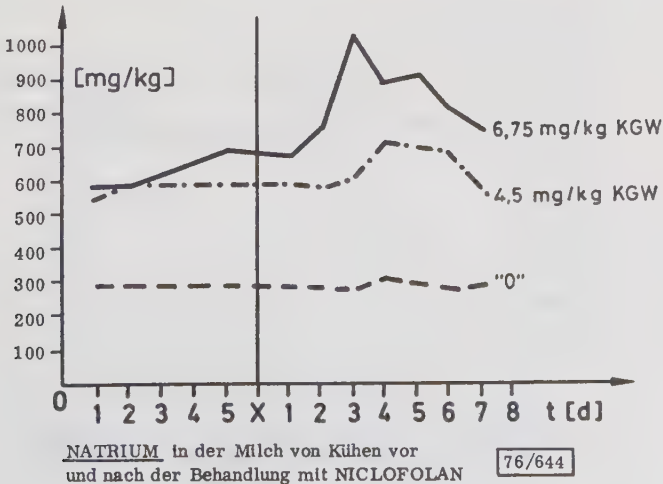


Abbildung 45

Die Wiederholung mit anderen Tieren veranschaulicht die Dosisabhängigkeit in der Beeinflussung des Natriumgehaltes der Milch (siehe Abbildung 45).

Kalium:

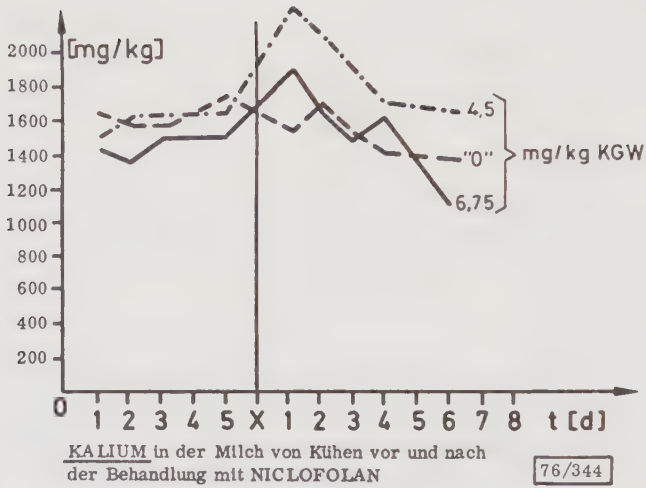


Abbildung 46

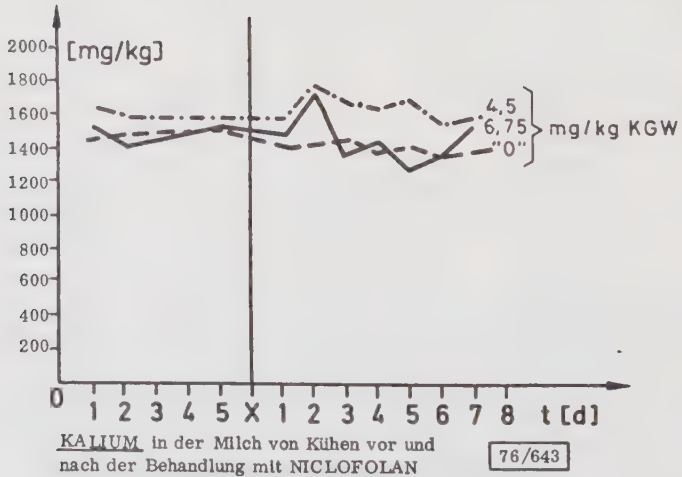


Abbildung 47

Der Kaliumgehalt der Milch der vier behandelten Kühe steigt am ersten und zweiten Tag nach der Behandlung um 20% - 30% über die Ausgangsdaten.

Magnesium:

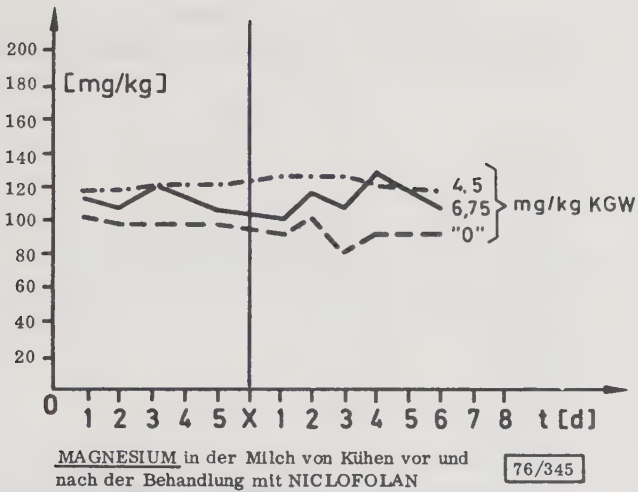


Abbildung 48

Nach Applikation der hohen Dosis ist eine leichte Zunahme des Magnesium-Gehaltes der Milch festzustellen. Im zweiten Versuch treten die Veränderungen auch bei dem Tier, das mit niedriger Dosis behandelt war, wesentlich deutlicher in Erscheinung (siehe Abbildung 49).

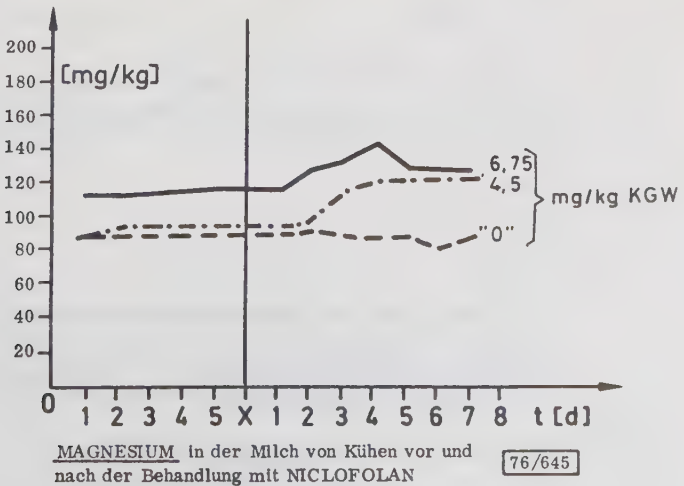


Abbildung 49

Calcium:

Beide Abbildungen (Abbildung 50 und 51) zeigen nur für die höhere Dosis Niclofolan eine Veränderung des Calcium-Gehaltes der Milch.

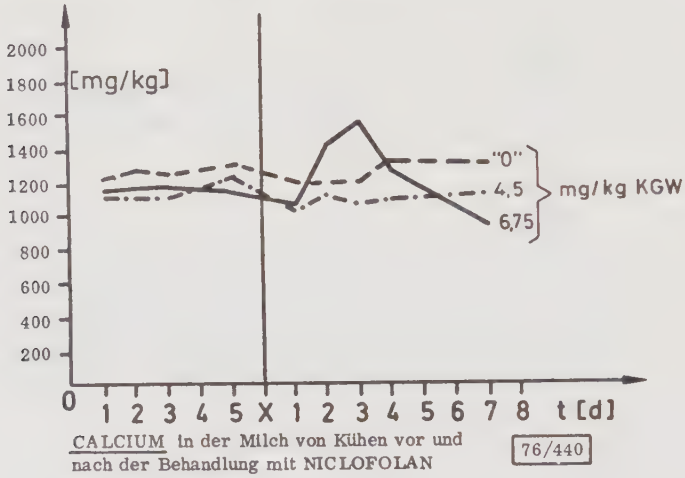


Abbildung 50

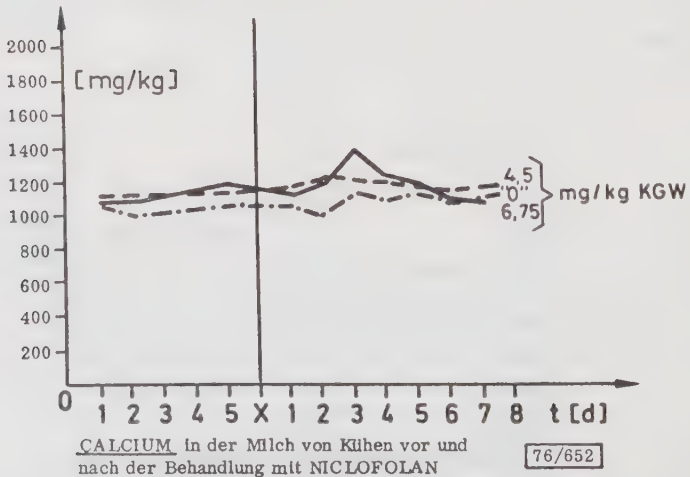


Abbildung 51

Chlorid:

Die Chlorionen-Konzentration, die bei normaler Sekretion relativ stabil bleibt, erhöht sich nach beiden Dosen bis zu drei Tagen nach der Behandlung.

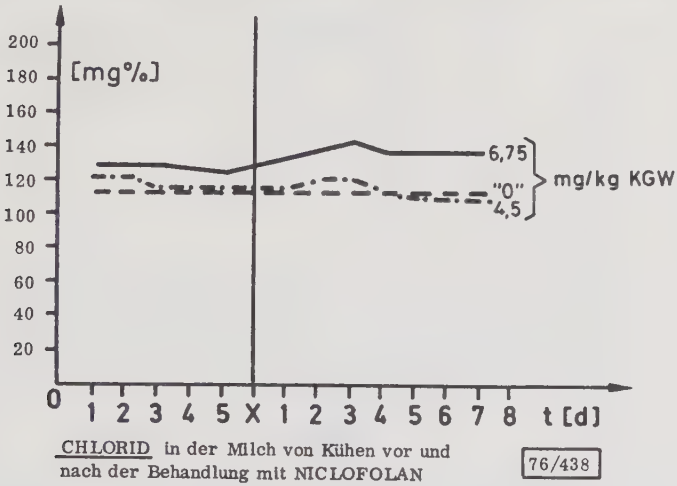


Abbildung 52

Gleichsinnige Verhältnisse zeigt der Wiederholungsversuch (siehe Abbildung 53).

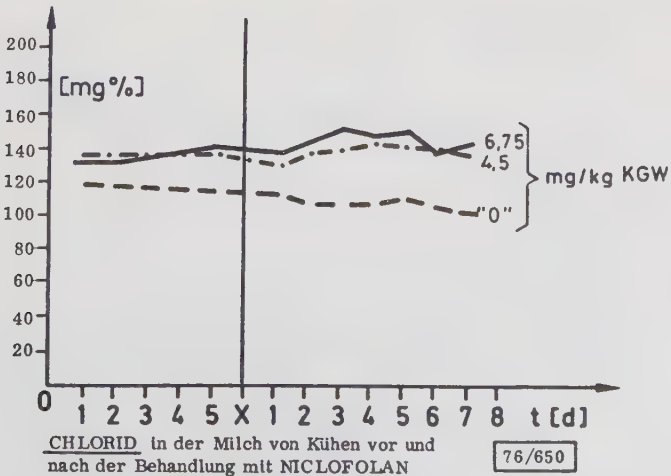


Abbildung 53

Phosphat:

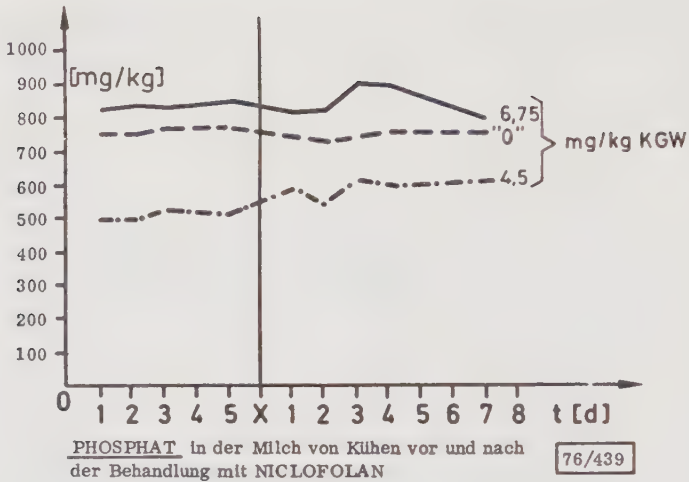


Abbildung 54

Eine Veränderung im Phosphat-Gehalt der Milch ist nur nach hoher Dosis in geringem Umfang feststellbar (siehe Abbildung 54).

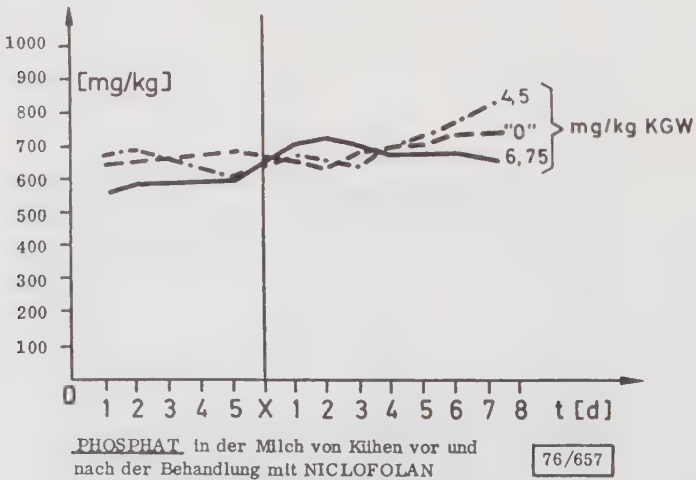
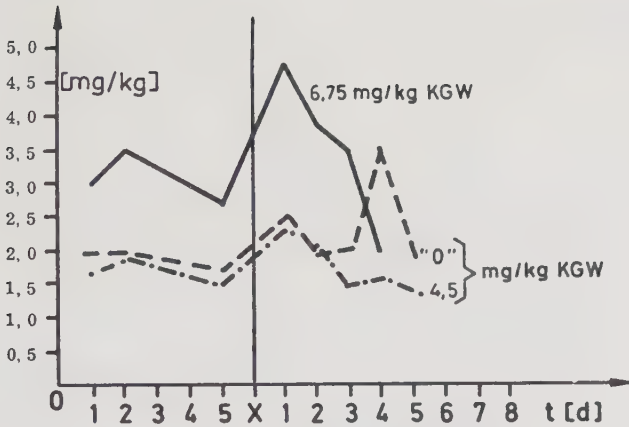


Abbildung 55

Der zweite Versuch bestätigt diesen Befund (siehe Abbildung 55).

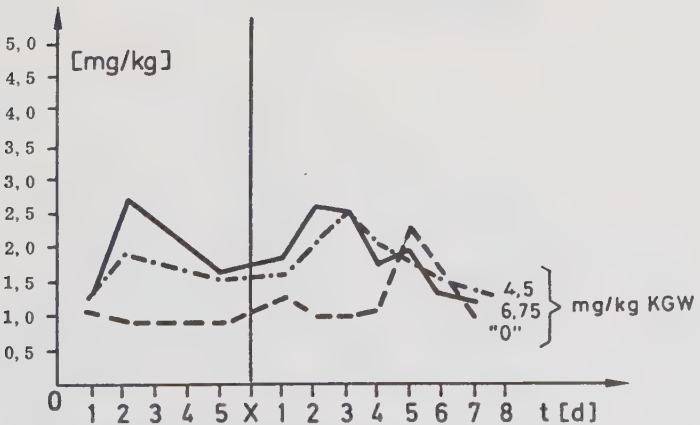
Pyruvat:



PYRUVAT in der Milch von Kühen vor und nach der Behandlung mit NICLOFOLAN

76/295

Abbildung 56



PYRUVAT in der Milch von Kühen vor und nach der Behandlung mit NICLOFOLAN

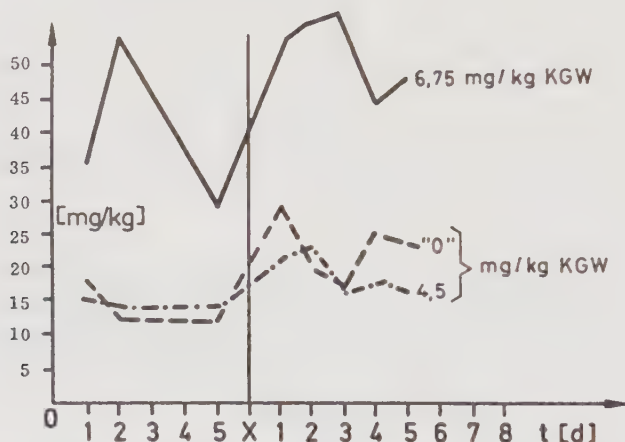
76/662

Abbildung 57

Aus den Abbildungen 56 und 57 geht ein Anstieg der Pyruvatwerte nach der Behandlung mit Niclofolan hervor. Diese Veränderung ist dann deutlicher, wenn die Ausgangswerte niedrig, die Tiere also eutergesund sind und keine bakteriellen Prozesse eingesetzt haben.

L(+)-Milchsäure:

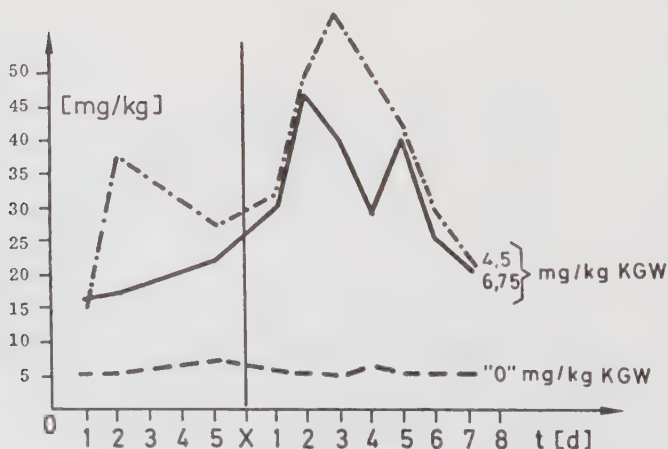
Abbildung 58 und Abbildung 59 zeigen, daß sich Laktat und Pyruvat gleichsinnig verhalten.



MILCHSÄURE in der Milch von Kühen vor und nach der Behandlung mit NICLOFOLAN

76/294

Abbildung 58



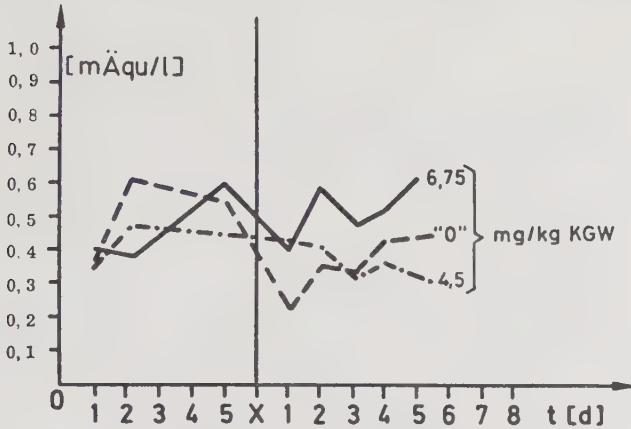
MILCHSÄURE in der Milch von Kühen vor und nach der Behandlung mit NICLOFOLAN

76/663

Abbildung 59

Freie Fettsäuren:

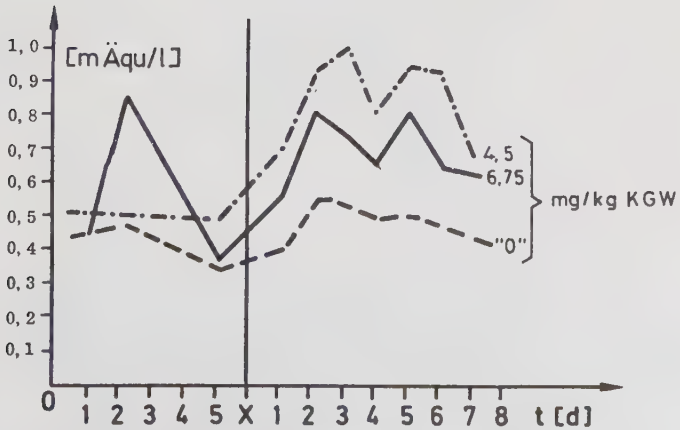
Kein Wert läßt auf eine Beeinflussung durch den Wirkstoff Niclofolan schließen.



FREIE FETTSÄUREN in der Milch von Kühen
vor und nach der Behandlung mit NICLOFOLAN

76/297

Abbildung 60



FREIE FETTSÄUREN in der Milch von Kühen
vor und nach der Behandlung mit NICLOFOLAN

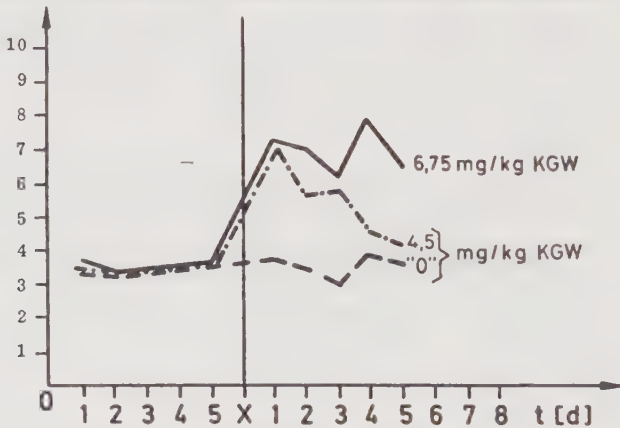
76/664

Abbildung 61

Während im ersten Versuch annähernd gleiches Niveau in beiden Versuchsphasen zu beobachten ist, zeigen im Wiederholungsversuch alle Tiere in unterschiedlicher Höhe gleichsinnige Veränderungen.

Ammoniak:

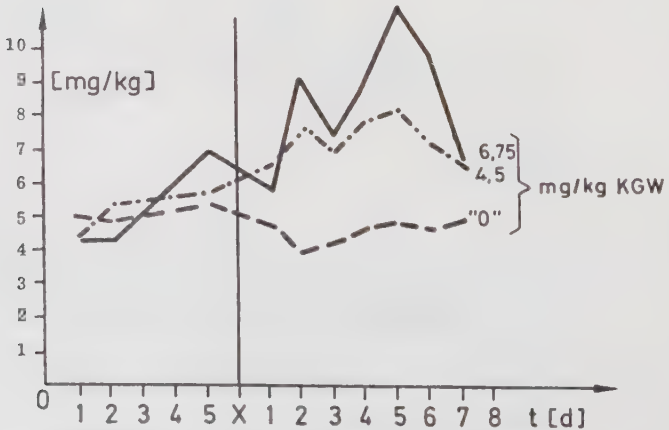
Dieses Abbauprodukt des Eiweißstoffwechsels steigt dosisabhängig auf annähernd die doppelte Konzentration. Jedoch können auch hier wie für Pyruvat und Milchsäure als Ursache mikrobielle Prozesse nicht ausgeschlossen werden.



AMMONIAK in der Milch von Kühen vor und nach der Behandlung mit NICLOFOLAN

76/296

Abbildung 62



AMMONIAK in der Milch von Kühen vor und nach der Behandlung mit NICLOFOLAN

76/664

Abbildung 63

3.3.3.2 Technologische Wertigkeit

pH-Wert und Gerinnungsfähigkeit:

Veränderungen beider Meßgrößen, die auf die Behandlung mit Niclofolan zurückzuführen sind, wurden unter 3.3.3.1 beschrieben.

Hemmstoffnachweis:

Sowohl im Brillantschwarz-Reduktions-Test als auch im Joghurt-Test zeigte sich, daß sekretorische Niclofolan-Rückstände auch nach Applikation erhöhter Dosen nicht als Hemmstoffe wirken.

3.3.3.3 Rückstandsbildung

Die Ausscheidungskurven zeigen die typische undulierende Charakteristik. Entsprechend der höheren Dosis liegt auch die Ausscheidungskonzentration auf höherem Niveau.

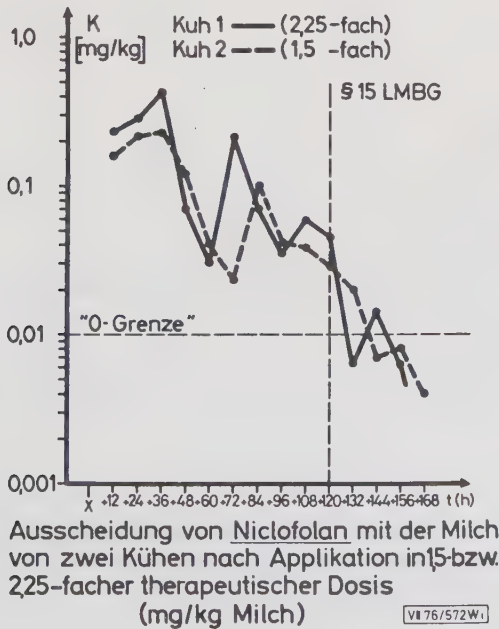


Abbildung 64

3.3.4 Nitroxinil

3.3.4.1 Physiologisch-biochemisches Profil

Orientierende Leistungs- und Gesundheitskriterien

ORIENTIERENDE LEISTUNGS- UND GESUNDHEITSKRITERIEN AUS DEM TAGESGEMELK VOR UND NACH DER APPLIKATION VON NITROXINIL (Dosis: 10 mg/kg KGW)				
Parameter T a g	Tagesgemelk [kg]	pH-Wert	Fettgehalt [%]	EZZ [1000/ml]
Anamnese 1	15,07	6,63	4,80	566
2	14,13	6,67	5,03	1597
3	14,23	6,63	5,13	1462
Versuch 1	13,77	6,67	5,40	1497
2	13,53	6,67	4,83	715
3	14,6	6,62	5,73	923
4	15,07	6,62	5,00	374
5	14,83	6,62	5,13	735
6	14,00	-	-	-
7	15,73	-	-	-
8	15,83	6,62	5,37	1752
9	15,5	6,63	3,80	834
10	15,10	6,60	4,60	1004
$\bar{X}_A$	14,48	6,64	4,99	1208,33
s Anamnese	0,52	0,02	0,17	560,36
VK	3,57%	0,35%	3,39%	46,37%
$\bar{X}_A$	14,80	6,63	4,98	979,25
s Versuch	0,81	0,025	0,59	444,96
VK	5,49%	0,38%	11,94%	45,44%

76/800

Tabelle 15

Das Tagesgemelk zeigt am ersten und zweiten Tag nach der Behandlung mit Nitroxinil einen geringen Abfall. Dagegen ist ein Einfluß auf die Meßgrößen pH-Wert und Fettgehalt nicht festzustellen.

Gerinnungsfähigkeit:

Die nach der Applikation von Nitroxinil beobachtete Verlängerung sowohl der Gerinnungs- als auch der Verfestigungszeiten der eingelabten Milch behandelte Tiere tritt unterschiedlich spät ein. Am ausgeprägtesten war dies am dritten und sechsten Tag p.a.

Enzyme:

PARAMETER DES PHYSIOLOGISCH-BIOCHEMISCHEN MILCHSTATUS (ENZYME) VOR UND NACH DER APPLIKATION VON NITROXINIL (Dosis: 10 mg/kg KGW)				
Parameter T a g		GOT [mU/ml]	GPT [mU/ml]	AP [mU/ml]
Anamnese	1	1,15	0,23	135
	2	0,8	-	135
	3	0,88	0,27	187
Versuch	1	0,65	0,80	205
	2	0,98	0,27	157
	3	1,37	0,17	163
	4	1,20	0,10	213
	5	1,97	0,13	207
	6	-	-	-
	7	-	-	-
	8	1,3	0,23	178
	9	1,17	0,20	172
	10	1,43	0,13	180
$\bar{x}_A$		0,94	0,25	152,33
s Anamnese		0,18	0,028	30,02
VK		19,51%	11,31%	19,71%
$\bar{x}_A$		1,26	0,25	184,38
s Versuch		0,38	0,23	21,30
VK		30,13%	91,29%	11,55%

76/804

Tabelle 16.

Nach hohem Anamneseniveau steigen die GOT-Werte p. a. an. GPT ist bei gleichem Mittelwert ($\bar{x}_A$) am ersten Tag p. a. erhöht, AP steigt bei wechselndem Verlauf insgesamt nach der Behandlung geringfügig an.

Laktose:

Der Laktose-Gehalt zeigt keine applikationsbedingte Abhängigkeit.

PARAMETER DES PHYSIOLOGISCH-BIOCHEMISCHEN MILCHSTATUS (LAKTOSE, KATIONEN, ANIONEN) VOR UND NACH DER APPLIKATION VON NITROXINIL (Dosis: 10 mg/kg KGW)						
Parameter Tag	Laktose [%]	Na ⁺ [mg/kg]	K ⁺ [mg/kg]	Mg ⁺⁺ [mg/kg]	Cl ⁻ [mg/kg]	
Anamnese 1	5,3	650	1600	117	1150	
2	5,0	680	1900	120	1150	
3	5,1	730	2250	115	1017	
Versuch 1	5,1	-	-	120	1075	
2	5,1	825	3000	110	1083	
3	4,9	755	2150	110	1083	
4	5,1	740	1800	113	1117	
5	5,1	790	2250	120	1133	
6	-	-	-	-	-	
7	-	-	-	-	-	
8	5,1	665	1400	118	1150	
9	5,1	940	2900	118	1200	
10	5,0	805	2150	115	1067	
$\bar{X}_A$	5,13	686,67	1916,67	117,33	1105,67	
s Anamnese	0,15	40,42	325,32	2,52	76,79	
VK	2,98%	5,89%	16,97%	2,14%	6,94%	
$\bar{X}_A$	5,06	788,57	2235,71	115,5	1113,5	
s Versuch	0,07	84,94	566,95	4,14	45,85	
VK	1,47%	10,77%	25,36%	3,58%	4,12%	

76/809

Tabelle 17

Kationen/Anionen:

Die Kationen-Gehalte an Na⁺ und K⁺ schwanken beträchtlich. Sie zeigen schon in der Anamnese-phase einen leichten Anstieg, der sich nach der Behandlung noch bis zum zweiten Tag fortsetzt. Das Kation Mg⁺⁺ und das Anion Cl⁻ verhalten sich weitgehend konstant. Die Werte für alle vier gemessenen Ionen lassen keine applikationsbedingte Verschiebung erkennen. Die Bestimmungsmethode für Calcium und Phosphat wurde erst im Laufe der Untersuchungen erstellt, so daß in diesem Zusammenhang keine Befunde erhoben werden konnten.

Metaboliten:

PARAMETER DES PHYSIOLOGISCH-BIOCHEMISCHEN MILCHSTATUS (METABOLITEN) VOR UND NACH DER APPLIKATION VON NITROXINIL (Dosis: 10 mg/kg KGW)					
T a g	Parameter	Pyruvat [mg/kg]	L(+)-Laktat [mg/kg]	FFA [mg/kg]	NH ₃ [mg/kg]
Anamnese	1	1,3	17	0,39	3,07
	2	1,7	35	0,37	2,87
	3	1,4	31	0,31	3,37
Versuch	1	2,1	42	0,49	3,40
	2	1,3	29	0,42	3,33
	3	1,2	24	0,43	3,67
	4	1,1	11	0,35	4,00
	5	1,3	20	0,34	4,1
	6	-	-	-	-
	7	-	-	-	-
	8	1,4	33	0,34	3,73
	9	1,3	23	0,30	4,23
	10	1,1	19	0,37	3,53
$\bar{x}_A$		1,47	27,67	0,36	3,10
s Anamnese		0,21	9,45	0,04	0,25
VK		14,16%	34,16%	11,56%	8,12%
$\bar{x}_A$		1,35	25,13	0,38	3,75
s Versuch		0,32	9,49	0,06	0,33
VK		23,76%	37,78%	16,28%	8,84%

76/797

Tabelle 18

Die Parameter Pyruvat, L(+)-Laktat, FFA und Ammoniak lassen keine signifikanten Veränderungen nach der Behandlung mit Nitroxinil erkennen. Nur Ammoniak steigt vom dritten bis fünften Tag p. a. leicht an; eine Abhängigkeit ist nicht eindeutig festzustellen.

3.3.4.2 Technologische Wertigkeit

pH-Wert und Gerinnungsfähigkeit:

Diese Parameter sind unter 3.3.4.1 beschrieben.

Hemmstoffnachweis:

Sekretorische Nitroxinil-Rückstände beeinflussen das Wachstum des BR-Testkeimes und der Joghurt-Kultur nicht.

3.3.4.3 Rückstandsbildung

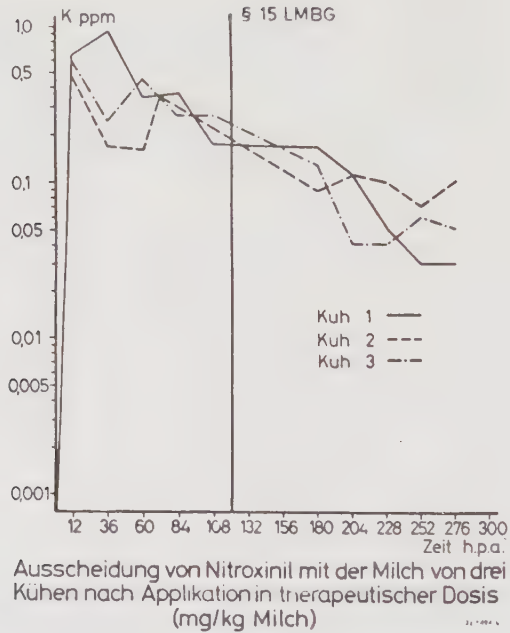


Abbildung 65

Ausgehend von hohen Initialkonzentrationen in der Größenordnung von 0,5 ppm wird das mit der parenteralen Applikation gesetzte Depot nur langsam abgebaut. 120 Stunden p.a. sind noch Nitroxinil-Werte in der Milch von 0,2 ppm nachweisbar. Die untere Erfassungsgrenze für Nitroxinil-Rückstände in der Milch liegt bei 0,005 mg/kg.

3.3.5 Oxyclozanid

3.3.5.1 Physiologisch-biochemisches Profil

Orientierende Leistungs- und Gesundheitskriterien

ORIENTIERENDE LEISTUNGS- UND GESUNDHEITSKRITERIEN AUS DEM TAGESGEMELK VOR UND NACH DER APPLIKATION VON OXYCLOZANID (Dosis: 10 mg/kg KGW)				
Parameter T a g	Tagesgemelk [kg]	pH-Wert	Fettgehalt [%]	EZZ [1000/ml]
Anamnese 1	14,43	6,77	4,62	143
2	14,27	6,77	5,70	103
3	14,63	6,77	5,70	125
Versuch 1	14,50	6,57	6,12	97
2	14,03	6,60	5,63	158
3	14,93	6,57	6,20	200
4	14,3	6,60	4,23	198
5	13,67	6,57	4,20	168
$\bar{X}_A$	14,44	6,77	5,34	123,67
s Anamnese	0,18	0,00	0,62	20,03
VK	1,25%	0,00%	11,68%	16,2%
$\bar{X}_A$	14,29	6,58	5,28	164,2
s Versuch	0,48	0,016	0,99	41,81
VK	3,33%	0,24%	18,8%	25,46%

Tabelle 19

Die erfaßten Milchmengenleistungen liegen dicht um den Mittelwert und lassen keine durch das Medikament bedingten Einflüsse erkennen. Der Anamnese-pH-Wert von 6,77 fällt nach der Behandlung ab. Eine eindeutige Veränderung in eine Richtung ist weder für den Fettgehalt noch für die Anzahl somatischer Zellen festzustellen.

Gerinnungsfähigkeit:

Individuell verschieden bewirkt Oxyclozanid eine meßbare Verlängerung bzw. Verkürzung der Gerinnungszeit eingelabter Milch.

Enzyme:

PARAMETER DES PHYSIOLOGISCH-BIOCHEMISCHEN MILCHSTATUS (ENZYME) VOR UND NACH DER APPLIKATION VON OXYCLOZANID (Dosis: 10 mg/kg KGW)				
Parameter T a g		GOT [mU/ml]	GPT [mU/ml]	AP [mU/ml]
Anamnese	1	0,27	0,27	238
	2	0,27	0,20	220
	3	0,23	0,23	212
Versuch	1	0,20	0,37	225
	2	0,30	0,33	225
	3	0,20	0,60	225
	4	0,20	0,50	245
	5	0,20	0,30	212
$\bar{x}_A$		0,257	0,25	223,33
s Anamnese		0,02	0,04	13,32
VK		8,99%	16,17%	5,96%
$\bar{x}_A$		0,22	0,42	226,4
s Versuch		0,045	0,13	11,82
VK		20,33%	30,07%	5,22%

Tabelle 20

Sowohl in der Anamnese- als auch in der Versuchsphase bleiben die GOT und AP relativ konstant. Nur die GPT zeigt am dritten Tag p. a. einen Anstieg, der zwei Tage später jedoch wieder ausgeglichen ist.

Laktose:

Der Milchzuckergehalt liegt vor und nach der Behandlung mit Oxyκλοzanid bei allen drei Tieren auf gleichem Niveau.

PARAMETER DES PHYSIOLOGISCH-BIOCHEMISCHEN MILCHSTATUS (LAKTOSE, KATIONEN, ANIONEN) VOR UND NACH DER APPLIKATION VON OXYCLOZANID (Dosis: 10 mg/kg KGW)								
Parameter T a g		Laktose [%]	Na ⁺ [mg/kg]	K ⁺ [mg/kg]	Mg ⁺⁺ [mg/l: g]	Ca ⁺⁺ [mg/l: g]	Cl ⁻ [mg/kg]	PO ₄ ³⁻ [mg/kg]
Anamnese	1	5,3	427	1760	118	1193	1030	600
	2	5,3	413	-	113	1220	1033	637
	3	5,0	457	2250	112	1213	1047	633
Versuch	1	5,3	393	2000	112	1210	1097	637
	2	5,2	443	2300	118	1253	1090	627
	3	5,1	480	2200	120	1250	1090	630
	4	5,1	363	2000	118	1170	1107	635
	5	5,1	330	2150	117	1190	1073	645
$\bar{x}_A$		5,2	432,33	2005	114,33	1208,67	1036,67	623,33
s Anamnese		0,17	22,48	346,48	3,22	14,01	9,07	20,31
VK		3,33%	5,31%	17,28%	2,81%	1,16%	0,8%	3,26%
$\bar{x}_A$		5,16	401,8	2130	117	1214,6	1091,4	634,8
s Versuch		0,09	60,31	130,38	3	36,55	12,42	6,94
VK		1,73%	15,01%	6,12%	2,56%	3,01%	1,14%	1,09%

Tabelle 21

Kationen/Anionen:

Die Natriumionen- und Chlorionen-Konzentration steigt nach der Behandlung mit Oxycclozanid leicht an. Die übrigen gemessenen Ionen bleiben über den ganzen Versuchsablauf auf nahezu stabilem Niveau.

Metaboliten:

PARAMETER DES PHYSIOLOGISCH-BIOCHEMISCHEN MILCHSTATUS (METABOLITEN) VOR UND NACH DER APPLIKATION VON OXYCLOZANID (Dosis: 10 mg/kg KGW)					
Parameter T a g		Pyruvat [mg/kg]	L + Laktat [mg/kg]	FFA [mÄqu/l]	NH ₃ [mg/kg]
Anamnese	1	1, 2	9, 0	0, 61	3, 9
	2	1, 3	9, 7	0, 34	4, 6
	3	1, 5	8, 7	0, 40	6, 5
Versuch	1	1, 1	9, 0	0, 44	4, 2
	2	1, 3	12, 7	0, 38	3, 2
	3	1, 4	12, 3	0, 46	2, 9
	4	0, 9	11, 7	0, 33	2, 8
	5	1, 5	13, 3	0, 37	2, 8
$\bar{x}_A$		1, 33	9, 13	0, 45	5, 0
s Anamnese		0, 15	0, 51	0, 14	1, 35
VK		11, 49%	5, 62%	31, 51%	26, 91
$\bar{x}_A$		1, 24	11, 8	0, 396	3, 18
s Versuch		0, 24	1, 67	0, 053	0, 59
VK		19, 42%	14, 16%	13, 43%	18, 66%

Tabelle 22

Während die L(+)-Milchsäure nach der Applikation zu leicht erhöhten Werten tendiert, zeigen die anderen drei Metaboliten keine Veränderung, die über die physiologische Schwankungsbreite hinausreicht. Die Ammoniak-Werte fallen nach der Behandlung auf das physiologische Niveau ab.

3.3.5.2 Technologische Wertigkeit

pH-Wert und Gerinnungsfähigkeit:

Beide Parameter sind unter 3.3.5.1 beschrieben.

Hemmstoffnachweis:

Das mit der Milch sezernierte Oxyclozanid wirkt weder im BR-Test noch im Joghurt-Test als Hemmstoff.

3.3.5.3 Rückstandsbildung

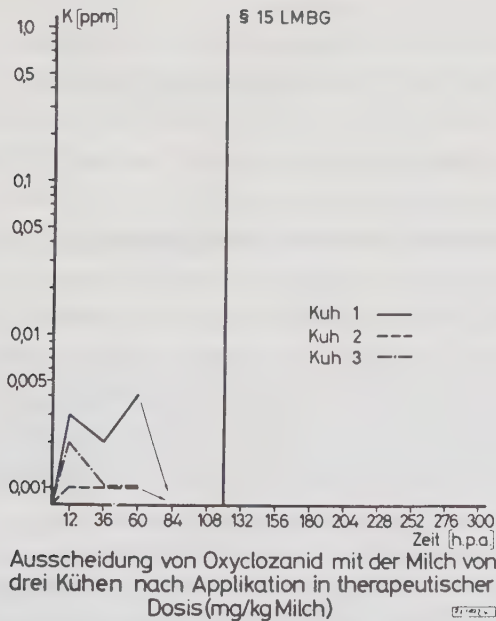


Abbildung 66

Die Ausscheidung der Originärschubstanz mit der Milch ist analytisch gerade noch erfassbar. 84 Stunden nach der Behandlung sind Oxyclozanid-Rückstände nicht mehr nachweisbar.

4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Bekämpfung des großen Leberegels, *Fasciola hepatica* L., kann langfristig nur dann erfolgreich sein, wenn diese die - wenngleich meist sehr kosten - aufwendige - Eliminierung des Zwischenwirtes integriert.

Die Vernichtung des Zwischenwirtes auf der Weide läßt sich nachhaltig durch eine Regulierung der Wasserverhältnisse und Tränkehygiene erreichen. Der Einsatz chemischer Molluscizide kann lediglich als Übergangslösung angesehen werden.

Im Wirt (Rind) erfolgt die Abtötung juveniler (mäßige bis gute Wirkung bei therapeutischer Dosis) und adulter Leberegel (von 83% bis 100%) wirkungsvoll mit den seit etwa 20 Jahren verwendeten Fascioliziden. Der Einsatz von Chemotherapeutika in relativ hoher Dosis kann jedoch nur dann zum Erfolg führen, wenn ausnahmslos alle exponierten Tiere einer systematischen Behandlung unterzogen werden (6, 49).

Jede Applikation einer pharmakologisch wirksamen Substanz belastet den Organismus und kann - neben den gewünschten Effekten - auch zu unerwünschten Folgen führen (30). So sind bei Tieren, die der Lebensmittelgewinnung dienen, im Lebensmittel Rückstände der Originärsubstanz bzw. ihrer Metaboliten zu erwarten. Außerdem kann die normale Zusammensetzung der Milch und somit deren technologische Wertigkeit beeinträchtigt werden. Die vorliegenden Untersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen und interpretieren.

4.1 Physiologisch-biochemisches Profil und technologische Wertigkeit der Milch nach Fasciolizid-Applikation

Bei der Analyse der orientierenden Leistungs- und Gesundheitskriterien fällt auf, daß das Tagesgemelk von Niclofolan bereits in therapeutischer Dosierung vermindert wird. Diese Störung nimmt mit höherer Dosis zu. Bei den anderen drei geprüften Wirkstoffen ist - wenn überhaupt - nur eine geringgradige Leistungsminderung festzustellen.

Der pH-Wert der Milch wird nach Oxyclozantid-Applikation leicht erniedrigt. Demgegenüber ist die Behandlung laktierender Kühe mit Niclofolan mit einer ausgeprägten Erhöhung des pH-Wertes der Milch verbunden. Die beobachtete pH-Verschiebung in den alkalischen Bereich führt zu Werten, die außerhalb des pH-Optimums des Rennin liegen, so daß die im Schrifttum berichteten käseereitechnologischen Störungen hiermit erklärt werden können.

Auch die in den thrombelastographischen Messungen festgestellten Verzögerungen in der Labgerinnung dürften zumindest zum Teil auf den erwähnten Anstieg des pH-Wertes zurückzuführen sein. Jedoch weisen die zwischen den Einzeltieren beobachteten Unterschiede darauf hin, daß die Labgerinnung nicht ausschließlich pH-abhängig ist (31, 32, 33, 34, 69).

Die Wirkstoffe Bromphenophos und Nitroxinil zeigen keine oder nur geringe Veränderungen des pH-Wertes und der Labgerinnungsfähigkeit der Milch.

Der Fettgehalt der Milch steigt nach Niclofolan-Behandlung in höheren, durchaus praxismöglichen Dosen an, während die drei anderen Fasciolizide keinen Einfluß erkennen lassen.

Desgleichen steigt die Anzahl somatischer Zellen in der Milch nur nach Niclofolan-Applikation. Dieses Phänomen könnte auf eine Permeabilitätsstörung im Alveolarbereich hindeuten.

Alle vier Fasciolizide zeigen als sekretorische Rückstände in der Anlieferungsmilch keine Wirkung im Hemmstoff-Test, können hierdurch vor einer Weiterverarbeitung der Milch also nicht erfaßt werden. Die Milchsäurebildung technologischer Kulturen wird durch Niclofolan nicht gestört (20).

Die Meßgrößen Tagesgemelk, Fettgehalt, Anzahl somatischer Zellen, pH-Wert und Labgerinnungszeit werden somit im wesentlichen nur durch Niclofolan beeinflusst. Geringgradigen Veränderungen durch den Wirkstoff Oxyκλοzanid steht eine eindeutige "Indifferenz" des Organophosphorsäureesters Bromphenophos gegenüber.

Wegen der herausragenden Bedeutung der bovinen Milchdrüse als Synthese- und Sekretionsorgan wurden die ausgewählten Parameter des "physiologisch-biochemischen Profils" als Indikatoren für mögliche Reaktionen der Milchkuh auf die pharmakologisch wirksamen Substanzen im Substrat Milch betrachtet.

Die Transaminasen (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und Glutamat-Pyruvat-Transaminase) treten nach der Applikation von Niclofolan und Oxyκλοzanid in der Milch erhöht auf. Nach erhöhten Dosen Niclofolan steigen die GOT-Werte annähernd auf Serumwerte an. Die Befunde zum Niclofolan lassen somit allgemein eine Zellschädigung vermuten. Bromphenophos verändert den Transaminasen-Gehalt der Milch nicht; Nitroxinil bewirkt keine eindeutige Veränderung. Die GPT nach Oxyκλοzanid-Applikation ist nur unwesentlich erhöht.

Auswirkungen auf das Kationen- und Anionen-Profil zeigen in geringem Ausmaß Bromphenophos und Oxyclozanid, sie erstrecken sich im wesentlichen nur auf den Kochsalzgehalt. Desgleichen ist nach Applikation von Dovenix keine Reaktion dieser Meßgrößen festgestellt worden. Demgegenüber sind die Mineralstoff-Gehalte mit Ausnahme von Calcium und Phosphat bereits nach Applikation therapeutischer Dosen Niclofolan beträchtlich erhöht. Der Kalium-Anstieg weist auf eine Zellschädigung hin. Calcium-Ionen als Katalysatoren der Labgerinnung fallen bei therapeutischer Niclofolan-Dosierung geringgradig ab und können somit nicht die Alkalisierung des Substrates kompensieren. Vielmehr wird die Labgerinnung noch mehr verzögert. Erst bei erhöhten Dosen Niclofolan - nach 2, 25-facher Dosis steigen alle Mineralstoffe in der Milch an - ist eine Teilkompensation zu verzeichnen. Die Calciumionenaktivität reicht aber auch in diesem Fall nicht aus, die Gerinnungsfähigkeit der Milch auf Werte eines unveränderten Substrates gelangen zu lassen (28). Die beobachtete Erhöhung des Mineralstoff-Gehaltes erklärt auch den für das Substrat Milch vergleichsweise starken pH-Wert-Anstieg. Errechnet man die Summe der gemessenen Kationen und der gemessenen Anionen in m mol/l und bildet daraus die Differenz unter Berücksichtigung des Phosphat-Gehaltes, der Pufferwirkung besitzt, so wird deutlich, daß ein Anstieg an Kationen auch einen pH-Wert-Anstieg nach sich ziehen muß, um die Elektroneutralität der Milch zu bewahren.

Die vorstehend dargestellten Veränderungen des physiologisch-biochemischen Profils nach Niclofolan-Applikation lassen ein Bild entstehen, das dem einer Sekretionsstörung sehr ähnelt. Diese Aussage wird jedoch durch die erhöhten Fett-, Calcium- und Phosphat-Gehalte abgeschwächt (8).

Die "Profilveränderung" der Milch wird noch ausgeprägter, wenn der Parameter Laktose berücksichtigt wird. Auch hier zeigt nur das Fasciolizid Bilevon einen erheblichen Einfluß. Der Milchzuckergehalt fällt bereits bei therapeutischer Dosierung bis zu 20% gegenüber den Anamnesewerten ab. Wird für eine weitergehende Interpretation der Befunde neben den beschriebenen Primärgrößen noch die von KOESTLER (50) eingeführte Chlor-Zucker-Zahl (CLZ) herangezogen, bestätigt sich das Bild einer Sekretionsstörung weiter (43, 44). Diese abgeleitete Größe ist der Quotient aus der Chlor-Ionen-Konzentration $\times 100$ geteilt durch den Laktose-Gehalt in %. Tabelle 23 zeigt die Verhältnisse bei therapeutischer und abgestuft erhöhter Dosierung.

CHLOR-ZUCKER-ZAHL DER MILCH VON KÜHEN VOR UND NACH DER BEHANDLUNG MIT NICLOFOLAN						
Tier Dosis Zeit	1 "0"	2 3 mg/kg	3 3 mg/kg	4 3 mg/kg	5 4,5 mg/kg	6 6,75 mg/kg
Anamnese 1	2,23	2,33	2,65	2,04	2,98	2,81
2	2,23	2,30	2,29	2,16	3,12	2,83
3	-	2,51	2,80	2,53	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	2,23	2,38	2,65	1,80	3,16	3,18
Versuch 1	2,09	2,42	2,83	2,40	3,02	3,11
2	1,96	2,60	3,33	2,20	3,49	3,55
3	2,04	2,89	3,75	2,67	3,48	3,95
4	1,96	2,71	3,35	2,60	3,67	3,65
5	2,00	2,98	3,83	2,51	3,44	3,70
6	1,95	-	-	-	3,44	3,33
7	1,93	2,76	-	2,40	3,24	3,33
8	-	2,50	4,00	2,24	-	-
9	-	2,71	2,64	2,22	-	-

VII 77/44 Lg

Tabelle 23

Die Normalwerte der in der Milch eutergesunder Tiere bestimmten CLZ liegen im Bereich von 1,5 - 2,5; Werte $> 3,0$ weisen auf eine Sekretionsstörung hin (50). Wie aus Tabelle 23 ersichtlich, steigt die Chlor-Zucker-Zahl nach der Behandlung mit Bilevon auf Werte an, wie sie bei einer Sekretionsstörung gefunden werden. Diese Beobachtung (CLZ) wird durch die Verminderung der Milchmengenleistung, die Erhöhung des pH-Wertes, die Verlängerung der Labgerinnungszeit, den Anstieg der Zellzahl, den Anstieg der GOT und die Erhöhung im Mineralstoffgehalt bestätigt.

Die untersuchten Metaboliten Pyruvat und L(+)Milchsäure als Abbauprodukte des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels und Freie Fettsäuren als lipolytische Primärprodukte treten lediglich nach der Applikation von Nitroxinil unverändert

in der Milch behandelter Tiere auf. Bromphenophos und Oxydiazinon verhalten sich im Einfluß auf diese Parameter sehr ähnlich, während das Niclofolan, weniger beim Einzeltier als vielmehr im Bestandsgemerk, deutliche Erhöhungen besonders der Milchsäure-Konzentration bewirkt. Jedoch können als Ursache hierfür mikrobielle Prozesse nicht ausgeschlossen werden. Ammoniak als Produkt kataboler Prozesse im Proteinstoffwechsel tritt in der Milch nur nach Bilevon-Behandlung merklich erhöht auf.

4.2 Rückstände (Bildung und Interpretation)

Der Schutz des Verbrauchers vor pharmakologisch wirksamen Substanzen, die am laktierenden Rind eingesetzt werden und zu Rückständen in der Milch führen können, besitzt bei jeder Behandlung absoluten Vorrang.

Eine Gefährdung des Verbrauchers kann dann gegeben sein, wenn in der Milch behandelter Tiere sekretorische Rückstände oberhalb der sogenannten toxi-kologischen Irrelevanzgrenze von 0,01 mg/kg vorhanden sind.

Nach § 15 LMBG ist es verboten, Milch von Kühen in den Verkehr zu bringen, die vor Ablauf von fünf Tagen mit in die Milch übergehenden Medikamenten behandelt sind. Diese pauschale Wartefrist kann im Einzelfall dem tatsächlichen Ausscheidungsverhalten des Wirkstoffes angepaßt werden. Für die untersuchten Fasciolizide ist zur Zeit nach geltendem Recht noch die Fünf-Tage-Frist anzuwenden.

Nach der Behandlung mit Acedist wird der Wirkstoff Bromphenophos mit nur geringer Peak-Konzentration innerhalb von 108 Stunden ausgeschieden. Der Schutz des Verbrauchers ist somit gewährleistet.

Die Rückstände von Niclofolan, einer erheblich toxischeren Verbindung, können Konzentrationen bis zu 0,5 mg/kg erreichen. Nach 120 Stunden liegen sie sehr nahe an der toxikologischen Irrelevanzgrenze. Der Verbraucherschutz scheint somit gerade noch gewährleistet.

Wesentlich ungünstiger ist das Ausscheidungsverhalten des parenteral applizierten Wirkstoffes Nitroxinil. Nach den durchgeführten Untersuchungen wäre eine Wartefrist von mehr als 14 Tagen der tatsächlichen Ausscheidung angemessen.

Sehr günstige Verhältnisse im Sinne des Verbraucherschutzes zeigt das Fasciolizid Diplin mit dem Wirkstoff Oxyclozanid. Die in der Milch gemessenen Konzentrationen liegen in den hier dargestellten Versuchen unterhalb der toxikologischen Irrelevanzgrenze und sind nur 60 Stunden nachweisbar.

Schlußfolgernd läßt sich feststellen, daß die Ausscheidung der Originärsubstanzen mit der Milch nur ein unbedeutender Weg für die Eliminierung dieser Pharmaka aus dem Organismus der Milchkuh ist.

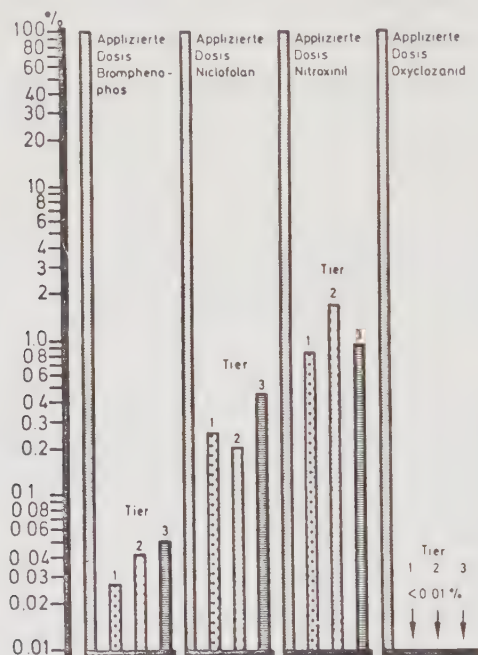
Dabei treten jedoch zwischen den Substanzen erhebliche Unterschiede auf, die zwei bis drei Zehnerpotenzen betragen. Tabelle 24 gibt die zahlenmäßigen Zusammenhänge zwischen Dosis, quantitativer und relativer Ausscheidung wieder.

BILANZIERUNG VON VIER FASCIOLIZIDEN			
Wirkstoff	Applizierte Dosis (mg)/Tier	Σ -Ausscheidung über die Milch (mg)/Tier	In der Milch gefundene Originärsubstanz in ‰ der Dosis
Bromphenophos	6000	1,597	0,27
	6000	2,766	0,41
	6000	3,091	0,52
Niclofolan	1500	3,836	2,56
	1500	3,057	2,04
	1500	6,658	4,44
Nitroxinil	6000	48,326	8,05
	5500	95,040	17,28
	5000	49,545	9,91
Oxyclozanid	6000	0,161	0,02
	5000	0,037	0,007
	5000	0,068	0,01

76/208 Lg

Tabelle 24

Das nachstehende Säulendiagramm veranschaulicht nochmals die relativen Unterschiede der Ausscheidung der Milch.



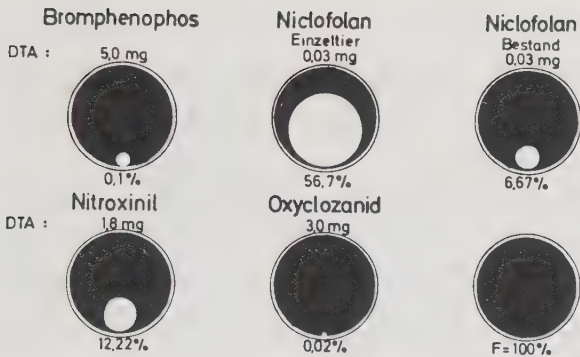
In der Milch gefundene Originär-
substanz/Tier in % der Dosis [5/20/14]

Abbildung 67

Die Abschätzung des unmittelbaren toxikologischen Risikos für den Verbraucher durch Verzehr von Milch nach Ablauf der 120-Stunden-Frist ist auf der Grundlage der abgeleiteten DTA (Duldbare Tägliche Aufnahme) an Hand einer Modellbetrachtung möglich:

Die 5,2 Millionen Milchkühe in der BRD produzieren pro Jahr 22 Milliarden Liter Milch, pro Kopf der Bevölkerung und Tag also einen Liter.

Unter der hypothetischen Voraussetzung, daß dieser Liter Milch/Person und Tag unmittelbar nach Ablauf der Schutzfrist post applicationem ermolken und verzehrt wird, decken die dann noch vorhandenen Rückstände der einzelnen Fasciolizide die jeweilige DTA zu folgenden Prozentsätzen ab:



Fasciolizidrückstände in 1 Liter Milch in Relation zur jeweiligen "duldbaren täglichen Aufnahmemenge" (hypothetisches Modell)

Berechnungsgrundlagen: DTA aus Tierversuchen extrapoliert ($\frac{NEL}{100}$)

1 l Milch enthält 120 Std. p. appl.: 0,005 mg Bromphenophos, 0,017 (0,002) mg Niclofolan, 0,22 mg Nitroxinil, 0,0005 mg Oxyclozanid

VL 76/766 La

* Mittelwertbildung durch ein Tier mit extrem hoher Ausscheidung beeinflusst

Abbildung 68

Das in Abbildung 68 dargestellte Modell wird erheblich dadurch relativiert, daß die Rinderpopulation in gefährdeten Gebieten höchstens zweimal im Jahr mit Fascioliziden behandelt wird. Die Berechnung der DTA beruht jedoch auf einer lebenslangen Exposition des Menschen gegen diese Fasciolizid-Rückstände.

4.3 Schlußfolgerungen

Die nachstehende Tabelle gibt zusammengefaßt und übersichtlich die Auswirkungen der vier Fasciolizide auf die gemessenen Parameter wieder.

EINFLUSS DER VIER WIRKSTOFFE AUF DIE AUSGEWÄHLTEN PARAMETER						
Parameter	Brom-phenophos	Niclofolan (therap. Dosis)		Niclofolan (erhöhte Dosis)	Nitro-xinil	Oxyclo-zanid
		Einzeltier	Bestand			
Tagesgemelk	0	-		- - -	0	0
pH-Wert	0	-	+++	+++	0	-
Gerinnungsfähigkeit	0	-	--	-	0 (-)	0 (+/-)
Fettgehalt	0	0		+	0	0
Anz. somat. Zellen	0	0 (+)		++	0	0
GOT	0	0		++	0 (+)	0
GPT	0	+		0 (+)	0	+
AP	0	0		+	0 (+)	0
Laktose	0	--		--	0	0
Natrium	0	++		++	0	+
Kalium	0	+		++	0	0
Magnesium	0	+		++	0	0
Kalzium	0	0		+		0
Chlorid	+	++		+	0	+
Phosphat	0	0	0	+		0
Pyruvat	0 (-)	0	+	+	0	0
L(+)Milchsäure	0 (+)	0	++	++	0	+
Freie Fettsäuren	0	+		0	0	0
Ammoniak	+	+	++	++	0 (+)	0
BR-Test	0	0	0	0	0	0
Joghurt-Test	0	0	0	0	0	0
Rückstand (120 h)	o. b. B.	0, 015	o. b. B.	0, 03	0, 2	o. b. B (84h)

0 = keine Veränderung

++ = erhöht

-- = vermindert

Anzahl Symbolik = Grad der Veränderung

VII 76/728 La

Es fällt auf, daß im wesentlichen nur bei dem Wirkstoff Niclofolan - auch bereits nach therapeutischer Dosierung - die überwiegende Mehrzahl der ausgewählten Parameter eine Veränderung erfährt.

Über die Prüfung zur Beeinflussung des Milchstatus nach Fasciolizid-Applikation hinausgehend sollten die Untersuchungen dazu dienen, am Beispiel der Fasciolizide ein Modell zur Prüfung möglicher technologisch bedeutsamer Beeinflussungen des Milchstatus nach Arzneimittel-Applikation zu entwickeln.

Hierzu können folgende Schnelltests, deren Ergebnisse definitiv nach maximal drei Stunden vorliegen - nachstehend als technologische Primärtests bezeichnet - zur Prüfung der Verwertbarkeit von Anlieferungsmilch in Molkereien angeboten und empfohlen werden:

pH-Wert-Messung
Thrombelastographie
Gerinnungsbildungszeit
Verfestigungszeit
Hemmstofftest (mikrobiologische Tests,
Laktat-Hemmungstest)

Diese vorstehenden einfachen und vergleichsweise wenig aufwendigen technologischen Primärtests ermöglichen eine schnelle Aussage zur industriellen Verwertbarkeit von Milch.

Wenn sich aus den Untersuchungsergebnissen eine negative Beeinflussung des Substrates Milch ableiten läßt, wie etwa verzögerte Labgerinnung oder gestörte Säurebildung, müssen weitergehende Analysen hinzugezogen werden, die dann allerdings wegen ihrer aufwendigen apparativen Voraussetzungen in besonders ausgerüsteten Labors durchzuführen sind. Hierfür bieten sich folgende technologische Sekundärtests wie Zellzahlbestimmung, Pyruvatbestimmung und Prüfung des Säuerungsverhaltens (Milchsäurebildung) an.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Abhandlung setzt sich mit folgender Aufgabenstellung zur Chemotherapie der Fasciolose des Rindes auseinander:

1. Messung der Wirkungen einmaliger therapeutischer und erhöhter Dosen von Fascioliziden auf ausgewählte Parameter des physiologisch-biochemischen Profils der Milch mit Hilfe spezifischer, empfindlicher und leistungsfähiger Methoden.
2. Prüfung des Einflusses eines veränderten physiologisch-biochemischen Milchprofils auf die technologische Wertigkeit des Substrates nach Fasciolizid-Applikation.
3. Bestimmung von Fasciolizid-Rückständen in der Milch als Grundlage einer systematischen Überwachung.
4. Beurteilung des toxikologisch-hygienischen Risikos von Rückständen für den Verbraucher.

Darüber hinaus sollten die Untersuchungen dazu dienen, am Beispiel der Fasciolizide ein Modell zur Erfassung technologisch bedeutsamer Veränderungen des Milchstatus nach Arzneimittel-Applikation zu entwickeln.

Im ersten Teil werden das internationale Schrifttum zum Einsatz von Fascioliziden beim Rind, die Bedeutung dieser Substanzen als Rückstände in der Milch unter lebensmittelhygienischen und technologischen Aspekten, die Analytik von Fasciolizid-Rückständen in Milch sowie die zur Interpretation der Ergebnisse in der Bundesrepublik Deutschland verbindlichen lebensmittel- und arzneimittelrechtlichen Regelungen diskutiert.

Im Mittelpunkt des zweiten Abschnittes stehen tierexperimentelle Untersuchungen zur Veränderung der Milch nach Behandlung laktierender Kühe mit den Fascioliziden Bromphenophos, Niclofolan, Nitroxinil und Oxyelozanid.

Aus dem Tagesgemelk bzw. der Herdensammelmilch wurden orientierende Leistungs- und Gesundheitskriterien (Fettgehalt, Anzahl somatischer Zellen, pH-Wert, Labgerinnungszeit), ausgewählte Enzyme (GOT, GPT, AP), Milchzucker, Kationen (Natrium, Kalium, Magnesium, Calcium), Anionen (Chlorid, Phosphat) und Metaboliten (Pyruvat, L-(+)-Laktat, Freie Fettsäuren, Ammoniak) bestimmt.

Zur Messung der Parameter GOT, GPT und AP ließen sich die aus der Hämatologie bekannten Methoden für die kontinuierliche Durchflußanalyse mit Modifikationen auch auf das Substrat Milch adaptieren. Für die Meßgrößen Laktose, Calcium, Chlorid, Phosphat und die Metaboliten konnten ebenfalls Methoden der kontinuierlichen Durchflußanalyse (Auto-Analyzer-II-System) angewendet werden. Die Messung der Kationen Natrium, Kalium, Magnesium erfolgte mit Hilfe der Atomabsorptionsspektralphotometrie. Die Fasciolizid-Rückstände wurden gaschromatographisch gemessen.

Die Dokumentation der Befunde erfolgt tabellarisch und/oder graphisch (68 Abbildungen; 25 Tabellen).

Im letzten Teil werden die erzielten Ergebnisse diskutiert und daraus nachstehende Schlußfolgerungen gezogen:

Das physiologisch-biochemische Profil der Milch zeigt nur nach der Applikation von Niclofolan deutliche Veränderungen. Diese betreffen vornehmlich den pH-Wert, die Gerinnungszeit, die Anzahl somatischer Zellen, die Milchzuckerkonzentration, den Mineralstoffgehalt und die Metaboliten Pyruvat und L(+)Laktat. Die Behandlung laktierender Kühe mit Niclofolan läßt ein Bild entstehen, das dem einer Sekretionsstörung nahekommt. Bei Überdosierung wurde jedoch eine Erhöhung des Fett-, Calcium- und Phosphat-Gehaltes beobachtet, die von den bei infektiösen Mastitiden bekannten Veränderungen abweicht.

Auch die technologische Verwertbarkeit der Milch wird nach den vorliegenden Untersuchungen nur durch Niclofolan-Applikation nachhaltig beeinflusst. Die Behandlung führt zu einer individuell unterschiedlichen Verlängerung der thrombelastographischen Gerinnungszeit.

Die Analytik von Fasciolizid-Rückständen hat einen Stand erreicht, der zum Schutz des Verbrauchers eine systematische Kontrolle der Milchkontamination beim Einsatz von Fascioliziden erlaubt.

Die Interpretation der Rückstände basiert auf dem § 15 LMBG (siehe 2.5.3.1). Danach ist nur für Nitroxinil eine über die Frist von fünf Tagen hinaus persistierende Kontamination der Milch mit Rückständen der Originärsubstanz gegeben, die deutlich oberhalb der sogenannten toxikologischen Irrelevanzgrenze von 0,01 mg/kg Milch liegt.

Als Meßgröße für die hygienisch-toxikologische Beurteilung der Fasciolizid-Rückstände wird die "Duldbare Tägliche Aufnahmemenge" für den Menschen herangezogen. Dieser Grenzwert wird bei den hier durchgeführten Untersuchungen mit begrenztem Tiermaterial - den Konsum von einem Liter Milch pro Person und Tag zu Grunde gelegt - aufbauend auf den "non effect level" wie folgt ausgeschöpft: 0,1% für Bromphenophos; 56,7% für Niclofolan; 12,22% für Nitroxinil und 0,02% für Oxyelozanid. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Rinderpopulation in den gefährdeten Gebieten höchstens zweimal pro Jahr einer Fasciolizid-Chemotherapie unterzogen wird. Der Berechnung der DTA liegt aber eine lebenslange Exposition des Verbrauchers gegenüber Rückständen zu Grunde.

Als technologische Primärtests zur Prüfung industrieller Verwertbarkeit von Milch bieten sich die pH-Wert-Messung, die Thrombelastographie (Gerinnungsbildungszeit, Verfestigungszeit) und der Hemmstofftest (mikrobiologische Tests, Laktat-Hemmungstest), als technologische Sekundärtests die Zellzahl- und Pyruvat-Bestimmung und die Prüfung des Säuerungsverhaltens (Milchsäurebildung) an.

SUMMARY

The present paper deals with the principles of chemotherapy of bovine fasciolosis:

1. Measurements of the effects of single and increased doses of fasciolicides on selected parameters of the physiologico-biochemical profile of the milk by means of specific, sensitive, and efficient methods.
2. Study of the influence of the changed physiologico-biochemical profile of the milk on its technological quality after application of fasciolicides.
3. Determination of fasciolicidal residues in milk as the basis of systematic control.
4. Judgement of the toxicologico-hygienic risk of residues as regards the consumer.

In addition, the investigations had the aim to develop a model for the determination of technologically important changes of the status of milk after drug application by the example of fasciolicides.

The following items are discussed in the first part: international literature reporting on the use of fasciolicides on cattle, significance of these substances as residues in milk under the aspects of food hygiene and technology, analytics of fasciolicidal residues in milk, and food and drug regulations in the Federal Republic of Germany in the light of the interpretation of results.

The particular subject of the second part are experiments on animals to study the changes in milk after treatment of lactating cows with the fasciolicides bromophenophos, niclofolane, nitroxinile, and oxyclozanide.

The milk of one day or the herd bulk milk was used to determine orientating yield and health criteria (fat content, number of somatic cells, pH value, time of rennet coagulation), selected enzymes (GOT, GPT, AP), lactose, cations (sodium, potassium, magnesium, calcium), anions (chloride, phosphate) and metabolites (pyruvate, L(+)lactate, free fatty acids, ammonia).

It was possible to adapt the methods known from hematology, by means of modifications, to the continuous flow analysis of milk in order to measure

the parameters GOT, GPT, and AP. Several methods of continuous flow analysis (Auto-Analyzer II system) could also be used for the parameters lactose, calcium, chloride, phosphate, and metabolites. The cations sodium, potassium, magnesium were measured by means of the atomic absorption spectrophotometry. The fasciolicidal residues were determined by gas chromatography.

The results are represented in tables and/or graphs (68 figures, 25 tables). In the final part, the results obtained are discussed, and the following conclusions drawn therefrom:

The physiologico-biochemical profile of the milk is subject to clear changes only after application of niclofolane. These changes are mainly concerned with the pH value, time of coagulation, number of somatic cells, lactose concentration, minerals, and the metabolites pyruvate and L(+)-lactate. The treatment of lactating cows with niclofolane gives a picture similar to that of disturbed secretion. The fat, calcium, and phosphate contents, however, were increased in the case of overdosage; this increase differs from the changes observed in cases of infectious mastitis.

The processability of milk is adversely affected by niclofolane application, too, as was observed in the studies. The treatment led to an individually different prolongation of the thrombelastographic time of coagulation.

The analytics of fasciolicidal residues have reached a state which allows systematic control to be performed of milk contamination by fasciolicides for the purpose of consumer protection.

The interpretation of residues is based on § 15 of the Federal German Food Law (see 2.5.3.1). It is only in the case of nitroxinile that the contamination of milk with residues of the original substance persists for longer than five days, which is clearly above the so-called limit of toxicological irrelevance of 0.01 mg/kg milk.

The hygienic-toxicological judgement of fasciolicidal residues is expressed by the "Admissible Daily Intake" for man. Based on the consumption of one litre of milk per person and day and building up on the non-effect level (NEL), this limit is reached by 0.1% of bromophenophos, 56.7% of niclofolane,

12.22% of nitroxinile, and 0.02% of oxyclozanide. It should, however, be taken into account that the livestock in suspected areas is subjected to chemotherapeutic treatment with fasciolicides no more than twice per year. The calculation of ADI, however, is based upon lifelong exposition of the consumer to these residues.

The following tests and determinations may be used as technological primary tests of the industrial processability of milk: determination of the pH value, thrombelastography (time of coagulation, time of curd setting), and the test for inhibitors (microbiological tests, lactate inhibition test); cell counting and pyruvate determination as well as the test for behaviour during acidification (lactic acid formation) may be used as technological secondary tests.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. AMSTERDAM CHEMIE FARMA N. V., Amsterdam, Niederlande:
Beipackprospekt Acedist (o. J.)
2. AMSTERDAM CHEMIE FARMA N. V., Amsterdam, Niederlande:
Report on the determination of Acedist residues in milk from a cow during 14 consecutive days after treatment with a single therapeutic dosage of this antiliverfluke compound
Analytical, Biochemical and Veterinary Departments of ACF Chemie-farma, Amsterdam, Holland (1971)
3. BAYER AG., Leverkusen:
Beipackprospekt Bilevon R und M (o. J.)
4. BERGMAYER, H. U. :
Methoden zur enzymatischen Analyse,
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse (1974)
5. BLÜTHGEN, A. :
Zur Analytik und Bedeutung von Rückständen chlorierter Insektizide und Fasciolizide in der Milch.
Dissertation Universität Kiel (1972)
6. BORAY, S. C. :
Bekämpfung der Fasciolose und der Dicrocoeliose des Rindes
Schweizer Archiv für Tierheilkunde 114, 639 (1972)
7. BROZEIT, H. E. :
5 Jahre großflächige Leberegelbekämpfung auf der Weserinsel Harriersand
Tierärztliche Umschau 29, (8) 435 (1974)
8. BUNDESANSTALT FÜR MILCHFORSCHUNG, Kiel
Die hygienische Wertigkeit der Rohmilch und Empfehlungen zu ihrer weiteren Verbesserung
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 21, (3) 201 (1969)
9. CELA GmbH., Ingelheim/Rh.
Beipackprospekt Diplin (o. J.)
10. CONNETA, A., STOOKEY, L. und ZEHUDER, H. :
An automated system for the determination of milkfat, protein and lactose in milk
Technicon International Congress New York (1971)
11. COOPER, R. G., WEBSTER, J. T. A. und HORTON, S. :
The determination of oxyclozanide in blood and milk of cows
Imperial Chemical Industries Limited, Category A Report (1969)
12. DEUTSCHE FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT, Bonn-Bad Godesberg:
Rückstände von Bloziden und Umweltchemikalien in der Milch.
Mitteilung I der Kommission zur Prüfung von Rückständen in Lebensmitteln. Boldt-Verlag 31 (1975)

13. DUREZ, J. und PECHEUR, M. :
Activite de quatre douvicides vis-avis de *Fasciola hepatica*
Ann.med.veter., Bruxelles, 117. 341 (1973)
14. EUZEBY, J. :
La fascioliasi epatobiliare sostenuta da *Fasciola hepatica*.
Importanza del problema.
Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino, Suppl. 20.7 (1973)
15. FROYD, G. :
Liver Fluke in Great Britain: a survey of affected livers.
Veterinary Record 97. 492 (1975)
16. FURMAGA, ST.
Epizootiologia fasciolozy w swietle badan krajowyon.
Medycyna Weterynaryjna, Warschau 30. 334 (1974)
17. GALESLOOT, TH. E. und HASSING, F. :
Eine schnelle und empfindliche Methode, mit Papierscheiben
Penicillin in Milch nachzuweisen.
Ned. Melk en Zuiveltijdschrift 16. 89 (1962)
18. GIBSON, T. E. :
Antielmintici per il trattamento della fascioliasi.
Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino, Suppl. 20, 122 (1973)
19. GLÖCKL, D., KONRAD, H. und SCHMOHL, J. :
Anwendungsmöglichkeiten physikalisch-chemischer Meßmethoden bei
technologischen Prozessen in der Milchindustrie. 2. Mitteilung:
Thrombelastographische Untersuchungen über das Gerinnungsverhalten
eingelabter Milch.
Die Nahrung 19. (4) 349 (1975)
20. HABAJ, B. und CZEKIERDA, A. :
Hemmung der Milchsäurebildung durch das Fasciolizid "Distolon"
XIV Intern. Milchwirtschaftskongreß Indien, Band I-D B. 4.171 (1974)
21. HAPKE, H. -J. :
Toxikologie für Veterinärmediziner, Ferdinand Enke Verlag,
Stuttgart (1975)
22. HEESCHEN, W. :
Untersuchungen zur quantitativen Analyse und lebensmittelhygienischen
Bedeutung bakterieller kataboler Reaktionen in Milch
Vet. Med. Habilitation Freie Universität Berlin (1971)
23. HEESCHEN, W., TOLLE, A. und BLÜTHGEN, A. :
Fasciolizide in Milch
Archiv für Lebensmittelhygiene 23. (1) 1 (1972)
24. HEESCHEN, W., BLÜTHGEN, A. und TOLLE, A. :
Zum Nachweis, Vorkommen und zur lebensmittelhygienischen
Bedeutung von Fascioliziden in der Milch
Referat Fasciolose-Symposium Tecklenburg (1973)
25. HELL, G. :
Erfahrungen mit dem Fasciolizid Acedist in einer Schleswig-
Holsteinischen Praxis
Der praktische Tierarzt, Hannover 54. 437 (1973)

26. HEISS, E. :
Versuchsbericht der Molkereischule Triesdorf
Unveröffentlichtes Manuskript (1969)
27. HOFFMANN, W. S. :
Technicon Standardmethode Lactose N-2b
Journal of Biological Chemistry 120, 51 (1937)
28. JENNES, R. und PATTON, ST. :
Principles of dairy chemistry. Verlag Wiley, New York (1959)
29. JUSKIEWICZ, T., RAKALSKA, Z. und DZIERZAWSKI, A. :
Effect embryopathique die 3, 3' -dichloro-5, 5' - dinitro-0, 0' -biphenol
chez le hamster d'oré
Europ. Journal Toxicologie 4/6, 525 (1971)
30. KAEMMERER, K. :
Wege und Fortschritte in der Veterinärpharmakologie
Veterinärmedizinische Nachrichten Heft 2. 99 (1974)
31. KÄSTLI, P. und RASELLI, R. :
Der Einfluß der Sekretionsstörungen bei der katarrhalischen
Mastitis des Rindes auf die Labfähigkeit der Milch
XV. Intern. Milchwirtschaftskongreß London, Bd. 1, 128 (1959)
32. KIERMEIER, F. und KEIS, K. :
Beeinflussung einiger Eigenschaften von Milch durch Euterentzündung
Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung 125, 96 (1964)
33. KIERMEIER, F., RENNER, E. und DJAFARIAN, M. :
Einfluß erhöhter Leukozyten-Ausscheidung auf chemische und
technische Eigenschaften der Milch. VII. Mitteilung: Einfluß auf die
Käseereitauglichkeit der Milch
Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung 132, 352 (1967)
34. KISZA, J., KRUK, A. und ROTKIEWICZ, W. :
Labgerinnungsvermögen der Mastitismilch
Milchwissenschaft 22, 558 (1967)
35. KOCH, O. G. und KOCH-DEDIC, G. A. :
Handbuch der Spurenanalyse 1/2, Springer Verlag, Berlin-
Heidelberg-New York (1974)
36. KRAACK, J. und TOLLE, A. :
Zum Nachweis von Hemmstoffen in Milch mit dem Brillantschwarz-
Reduktionstest
Archiv für Lebensmittelhygiene 20, (7) 145 (1969)
37. MERKEL, O. :
Förderung der Leberegelbekämpfung im Land Schleswig-Holstein
durch das Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten
und seine Viehseuchenfonds
Vortrag auf dem Symposium über Leberegel-, Magendarmwurm-
und Lungenwurmbekämpfung beim Rind, Husum (1976)

38. MOLTZEN, B. :
Persönliche Mitteilung
39. NANSSEN, P. und NIELSEN, K. :
Frequency and epidemiology of fascioliasis in Denmark
Nordisk Veterinärmedicin 26, 33 (1974)
40. NEUMANN, H. -J. :
Dokumentation Acedist
Merleux-Rentschler, 20 (o. J.)
41. PITOIS, M. und LEIMBACHER, F. :
Le prevision de la Fasciolose
Rec.med.vet., Paris 149, 1293 (1973)
42. QUIROZ ROMERO, H., BLANCH VILA, D.H.C. und CORDOBA, L.F.de:
Effect of fascioliasis on the milk yield of housed cows
Veterinaria Mexico 5, 31 (1974)
43. REICHMUTH, J., TOLLE, A. und HEESCHEN, W. :
Zur Aussagekraft zytologischer und biochemischer Parameter der
Milch für die Erfassung von Sekretionsstörungen und Mastitiden
Archiv für Lebensmittelhygiene 25, (2) 32 (1974)
44. RENNER, E. :
Der Laktosegehalt der Milch als Indikator für Eutererkrankungen
Archiv für Lebensmittelhygiene 23, (2) 25 (1972)
45. REUSS, M. und HILLMANN, J. -G. :
Untersuchungen über die Anwendung des injizierbaren Präparates
"Dovenix" zur Behandlung der Rinderfasciolose
Tierärztliche Umschau 26, (9) 442 (1971)
46. ROJAHN, A. :
Leberegelbekämpfung - freiwillig oder mit staatlichen Mitteln
Tierärztliche Umschau 27, (2) 47 (1972)
47. ROSENBERGER, G. :
Lehrbuch der Rinderkrankheiten, Verlag Paul Parey, Berlin
und Hamburg (1970)
48. SAZANOV, A. M. :
Prophylaxe der Fasciolose und Meltoration
Veterinarija, Moskau 5, 70 (1974)
49. SCHNEIDER, F., ECKERT, J. und KELLER, H. :
Ein Modellversuch zur planmäßigen medikamentellen
Fasciolose-Bekämpfung
Schweizer Archiv für Tierheilkunde 117, 185 (1975)
50. SCHÖNHERR, W. :
Tierärztliche Milchuntersuchung 255, S.Hirzel Verlag, Leipzig (1965)
51. SLUIS, L. van der:
Leberegelbekämpfung in Friesland
Vortrag auf dem Symposium über Leberegel-, Magendarmwurm-
und Lungenwurmbekämpfung beim Rind, Husum (1976)

52. SOCIETE DES USINES CHIMIQUES RHONE-POULENC
Nitroxinil, Mode Operatoire Pour le Dosage de Residus dans le lait,
Par Chromatographie Gaz-liquide. Vitry (1971)
53. SUHREN, G. :
Persönliche Mitteilung
54. SUHREN, G. :
Zur Eignung der enzymatischen Pyruvatbestimmung für die Messung
der bakteriellen Belastung von Milch
Dissertation Universität Bonn (1973)
55. SUHREN, G., HEESCHEN, W. und TOLLE, A. :
Automatisierte und manuelle enzymatische Pyruvatbestimmung
in der Milch
Milchwissenschaft 31, (5) 257 (1976)
56. TECHNICON
Method No. SE 4-0006 FC 4 (1974)
57. TECHNICON
Clinical Method No. 10 (1974)
58. TECHNICON
Clinical Method No. 22 (1974)
59. THOMASOW, J. :
Untersuchungen an Labgallerten von Milch mit dem
Hellige-Thrombelastographen
Milchwissenschaft 23, (12) 725 (1968)
60. TOLLE, A., HEESCHEN, W., REICHMUTH, J. und KIND, H. :
Trinkmilch in der BRD. Eine Untersuchung zum bakteriologischen,
biochemischen und rückstandsanalytischen Status
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 23, (4) (1971)
61. TOLLE, A., HEESCHEN, W., WERNERY, H., REICHMUTH, J.
und SUHREN, G. :
Die Pyruvatbestimmung - ein neuer Weg zur Messung der
bakteriologischen Wertigkeit von Milch
Milchwissenschaft 27, (6) 343 (1972)
62. TOLLE, A., HEESCHEN, W., BLÜTHGEN, A., HAMANN, J.
und REICHMUTH, J. :
Rückstände von Bioziden und Umweltchemikalien in der Milch
- eine Untersuchung über Nachweis, Vorkommen und lebens-
mittelhygienische Bedeutung
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 25, (4) 369 (1973)
63. UENO, H., ALVAREZ, J. M., MERGEN, A. M. R. de und
SANCHEZ, V. M. :
Betrachtungen über das Vorkommen parasitärer Erkrankungen des
Rindes, insbesondere der Fasciolose in der Dominikanischen Republik
Nat. Inst. Anim. Health, Quart 13, 59 (1973)

64. US DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE,
FOOD AND DRUG ADMINISTRATION
Pesticide Analytical Manual Volume I
Methods which detect multiple Residues (1968)
65. VEMIE, Kempen
Beipackprospekt Dovenix (o. J.)
66. VARIAN TECHTRON
Analytical methods for flame spectroscopy, Australia (1972)
67. WERNERY, H. :
Zur Beurteilung der bakteriologisch-hygienischen Wertigkeit von
Milch durch die quantitative Bestimmung von Pyruvat und die
Computer-Bild-Analyse von Plattenkulturen
Dissertation Freie Universität Berlin (1972)
68. WIRTH, S. und FELTKAMP, H. :
Gaschromatographische Rückstandsbestimmung von Bayer 9015
in Milch
Farbenfabriken Bayer AG, Pharma-Bericht Nr. 1103 (1969)
69. WOLF, H. -J. :
Auswirkungen klimatischer Faktoren auf Sekretionsstörungen
sowie auf Menge und Eigenschaften der Milch
Dissertation Universität Gießen (1972)
70. WUPPER, O. und REUSS, U. :
Prüfung des fascioliziden Präparates "Acedist" unter
tierärztlichen Praxisbedingungen
Tierärztliche Umschau 26, (1) 36 (1972)
71. ZALL, D. M., FISHER, D. und GARNER, M. O. :
Technicon Standardmethode Chlorid N-56
Analytische Chemie 28, 1665 (1956)

LEBENS LAUF

Am 22. Dezember 1948 wurde ich, Manfred Johannes Kaiser, als einziger Sohn des Meieristen Karl Kaiser (verst.) und seiner Ehefrau Gretchen, geb. Dibbern, in Bekdorf Krs. Steinburg/Holstein geboren.

Nach der Volksschule in Krummendiek besuchte ich von 1959 bis 1967 den altsprachlich-humanistischen Zweig der Kaiser-Karl-Schule in Itzehoe, an der ich im Juni 1967 das Abitur ablegte.

Mit dem Wintersemester 1967/68 nahm ich das Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München auf, das ich im November 1972 mit dem Staatsexamen abschloß.

Die Bestallung als Tierarzt wurde mir im März 1973 erteilt.

In der Zeit von März 1973 bis April 1975 war ich als Praxisassistent und -vertreter tätig. Seit dem 1. Mai 1975 bin ich als wissenschaftlicher Angestellter im Institut für Hygiene der Bundesanstalt für Milchforschung in Kiel beschäftigt.

Herrn Professor Dr. A. Tolle danke ich für die Thematik
und die Voraussetzung zur Durchführung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern des Instituts für Hygiene
für ihre stets gewährte Unterstützung.

